



TITLE:

抗菌性薬物の培地中での安定性に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

岩本, 喜久生

CITATION:

岩本, 喜久生. 抗菌性薬物の培地中での安定性に関する研究. 京都大学, 1975, 薬学博士

ISSUE DATE:

1975-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r2680>

RIGHT:

薬

68 函

1-0

主論文

抗菌性薬物の培地中での
安定性に関する研究

岩 本 喜 久 生

抗 菌 性 薬 物 の 培 地 中 で の 安 定 性 に 関 す る 研 究

岩 本 喜 久 生

目 次

総論の部	頁
緒 言	1
第 I 章 Isoniazid 誘導体の安定性におよぼす培地成分の影響と <i>in vitro</i> 抗菌活性	3
I-1 Isoniazid 誘導体の安定性におよぼす培地成分の影響	3
I-a 水溶液中での安定性	3
I-b 培地中での安定性	6
I-c 培地中での安定性に影響をおよぼす因子	9
I-d 安定性におよぼすアミノ酸の影響	11
I-e 安定性におよぼす触媒効果	13
I-f 重水中での触媒効果	18
I-g 培地中での分解の機構	19
I-h 考 察	20
I-2 Isoniazid 誘導体の <i>in vitro</i> 抗菌活性	20
2-a <i>in vitro</i> 抗菌力試験法	21
2-b 最少発育阻止濃度の検定	21
2-c 抗菌活性におよぼす時間的因子	22
2-d 考 察	24
I-3 ま と め	24
第 II 章 Penicillin 誘導体の安定性と <i>in vitro</i> 抗菌活性に およぼす銅イオンの影響	25
II-1 Penicillin 誘導体の安定性におよぼす銅イオンの影響	25
1-a 分解産物の同定	25
1-b 水溶液中での安定性	28
1-c 培地中での安定性	30

i - d	銅イオンの触媒効果および複合体形成効果	32
- e	銅イオンの効果におよぼす培地成分などの影響	33
- f	考 察	35
Ⅰ - 2	Penicillin 誘導体の <i>in vitro</i> 抗菌活性におよぼす銅イオンの影響	36
2 - a	最少発育阻止濃度の検定	36
- b	抗菌活性におよぼす時間的因子	37
- c	銅イオンの抗菌活性	39
- d	複合体形成による脂溶性の増加	40
- e	考 察	40
Ⅰ - 3	ま と め	41
第Ⅲ章	Nitrofurán 誘導体の菌体共存下での消失挙動と <i>in vitro</i> 抗菌活性	42
Ⅲ - 1	Nitrofurán 誘導体の菌体共存下での消失挙動	42
1 - a	培地中での安定性	43
- b	菌体共存下での消失現象	45
- c	消失におよぼす菌体濃度の影響	46
- d	消失におよぼす薬物の初濃度の影響	47
- e	消失におよぼす培地成分の影響	49
- f	消失におよぼす <i>p</i> -chloromercuribenzoate の影響	50
- g	薬物の菌細胞壁への結合	51
- h	薬物と菌細胞内成分との相互作用	53
- i	安定性におよぼす L-cysteine の影響	55
- j	考 察	58
Ⅲ - 2	Nitrofurán 誘導体の <i>in vitro</i> 抗菌活性	58
2 - a	感受性菌に対する最少発育阻止濃度の検定	58

2 - b 耐性菌に対する最少発育阻止濃度の検定	59
- c 考 察	60
Ⅲ - 3 ま と め	60
結 論	62
謝 辞	66
実験の部	67
第Ⅰ章 実験の部	67
第Ⅱ章 実験の部	82
第Ⅲ章 実験の部	94
引用文献	106

総 論 の 部

緒 言

抗菌性薬物の投与計画は、主として吸収、分布、体内変化、排泄などのいわゆる生体内運命および *in vivo*, *in vitro* における抗菌活性などを総合することによって行われねばならない。前者に関しては、すでにサルファ剤をはじめ多くの抗菌性薬物の生体内運命が明らかにされることにより、薬動力学的な指針が与えられている。一方、*in vivo* および *in vitro* における抗菌活性に関しても多岐にわたる研究例が報告されており、特に後者は主として最少発育阻止濃度の検定により試験されているが、培養期間における薬物の安定性を軽視しているところに問題があると考えられる。比較的長期にわたる抗菌力試験において薬物の有効濃度が不変であるという保証は何ら与えられず、その結果として得られた抗菌活性の評価も信頼性に乏しくならざるを得ない。薬物の有効性が試験菌の発育に必須とされる培地成分などにより複雑な変化を受ける可能性は十分予測されねばならない。培養条件における抗菌性薬物の消長が実際の抗菌力試験の結果にいかなる影響をおよぼすかを検討することは、このものの薬剤療法において適切かつ有効な投与方法や安定な剤型を設定するうえで極めて重要な課題であるが、研究報告も少なく系統的研究は全く行われていない。

著者は抗菌性薬物が培地成分ならびに試験菌の共存により不活性化もしくは活性化される可能性に着目し、水溶液中における分解現象が知られている isoniazid 誘導体および penicillin 誘導体、さらに菌体共存により培養液からの著しい消失が予想される nitrofurantoin 誘導体の三系列の抗菌性薬物を選び、それぞれ、培養試験が比較的長期にわたる場合、培地成分として微量の金属イオンが必要とされる場合および菌体との相互作用が極めて速かな場合を主要な検討課題とし、培地中での安定性ないし消失におよぼす培地成分の影響と *in vitro* 抗菌活性について系統的に検索した。これにより、培養条件下

での薬物の消長と抗菌活性との関連性について基礎的知見を得るとともに培地成分の示す特異な役割を明らかにすることができた。

以下、三系列の薬物について得られた結果を三章にわたり論述する。

第I章 Isoniazid誘導体の安定性におよぼす培地成分の影響と *in vitro* 抗菌活性

長期におたる抗菌力試験に際しては、培養条件における薬物の安定性が試験結果を左右する重要な一因になると考えられるが、抗菌力が通常2〜3週間後に評価される抗結核剤などはその典型的な例であると言える。isoniazid (INAH) 誘導体は現在使用されている十数種の抗結核化学療法剤のうち最も強力なものの一つであり、その構造活性相関¹⁾や物理化学的性状^{2), 3)}に関してはすでに詳細な報告が見られる。しかし、*in vitro* 抗菌活性を正しく評価するうえで培養条件における安定性を中心に検討した例は少なく、Golwellら⁴⁾ および金井ら⁵⁾の報告を見るにとどまる。

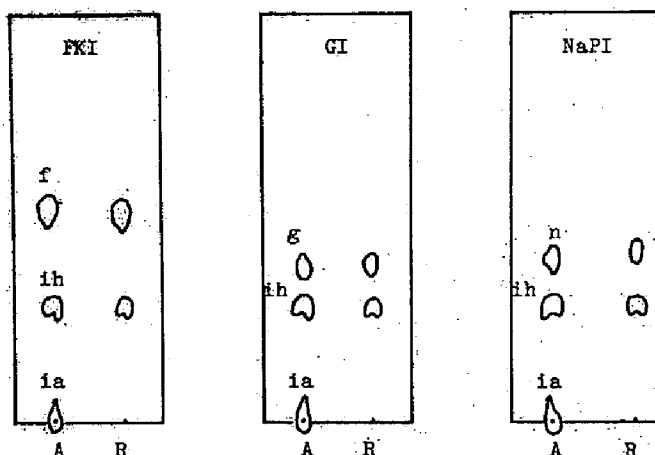
本章では、モデル薬物として *furylmethylketone isonicotinoylhydrazone* (FKI), *glucose isonicotinoylhydrazone* (GI), および *sodium pyruvate isonicotinoylhydrazone* (NaPI) の三種の INAH *hydrazone* を選び、結核菌培養試験に常用される七種の培地中での安定性およびこれにおよぼす培地成分の影響を明らかにするとともに、これら諸点と *in vitro* 抗菌活性との関連について考察を加えた。

I-1 Isoniazid 誘導体の安定性におよぼす培地成分の影響

INAH *hydrazone* 類の安定性に関しては、*glucuronolactone* 誘導体⁴⁾ および *methanesulfonate* 誘導体⁶⁾ に報告例が見られ、いずれも INAH を生成する加水分解反応が主要な分解経路であるとされている。培養条件下での安定性に関しては、血漿ないし血清における研究例があるにとどまっている⁴⁾。ここでは、対照実験として予め水溶液中での安定性を調べ、ついで培地中での安定性を比較検討するとともに、動力学的解析を応用して分解におよぼす培地成分の影響と分解機構の解明を試みた。

I-1-a 水溶液中での安定性

分解産物などの検査は薄層クロマトグラフ (TLC) 法により確認した。また水溶液中での安定性については、主として pH 2.0〜10.0 となる各種の緩衝溶液を用いて検討した。



f) FK1, ih) INAH, ia) INA, g) GI, n) NaPI

A) Authentic sample, R) Reaction mixture

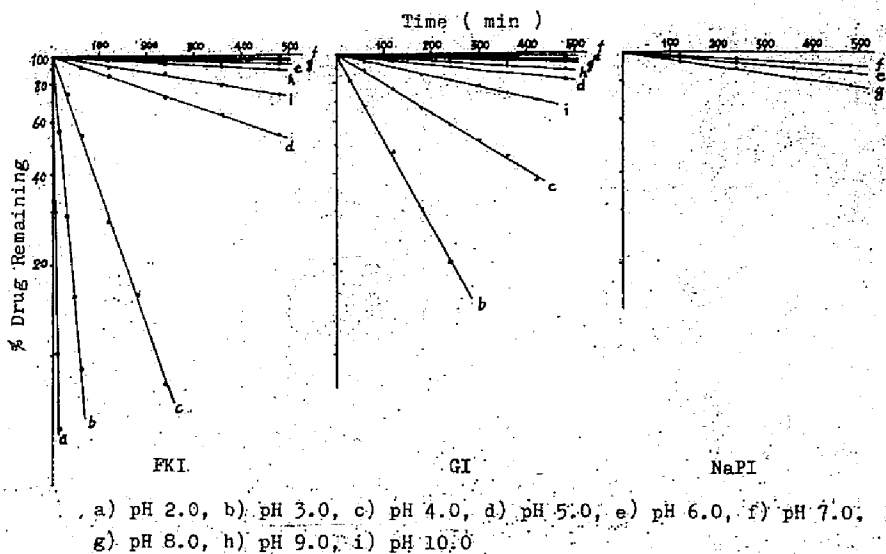
Plate: Silica gel G (Merck) 25g/50ml, dried (100°, 30min)

Solvent system: Isopropanol-chloroform (1:1)

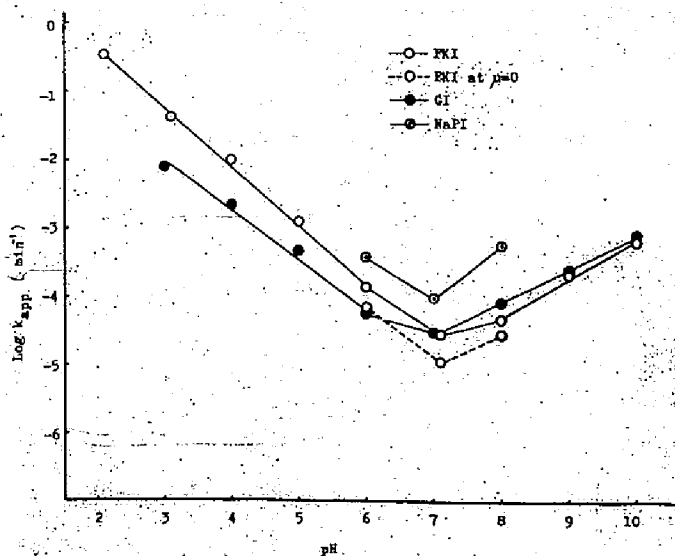
Spray reagent: Na-Pentacyanoammineferate

第1図 Thin Layer Chromatoplate of INAH Derivatives and Their Degradation Products

第1図から、分解経路はいずれも INAHのみを生成する加水分解反応であることが明らかとなった。また第2図から、この加水分解は見かけ上、擬一次反応速度式に従うことが認められた。第3図は算出した見かけの分解速度定数 k_{app} を pH 値に対してプロットしたものである。これから明らかのように、FKI をはじめいずれの薬物とも pH7 の中性付近において最も安定であり、これらの加水分解反応における一般酸塩基触媒の関与する可能性が示唆された。なお一部についてイオン強度の影響を調べたが、顕著な変化は認められなかった。



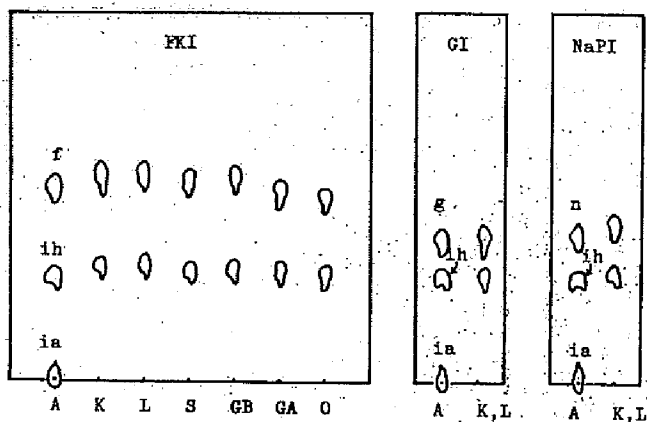
第2图 Stability of INAH Derivatives in Buffer Solutions at 37°



第3图 pH-Rate Profile for the Degradation of INAH Derivatives in Buffer Solutions at 37°

1-1-b 培地中での安定性

INAH が成る種の金属イオンや蛋白質との共存により不活性化される現象は数例報告されているが^{7)~10)}、その hydrazone 類に関して速度論的検討を試みたものは見当たらない。ここで使用した7種の培地のうち、五種は液体培地であり他は固体培地である。



f) FK1, 1h) INAH, 1a) INA, g) GI, n) NaPI

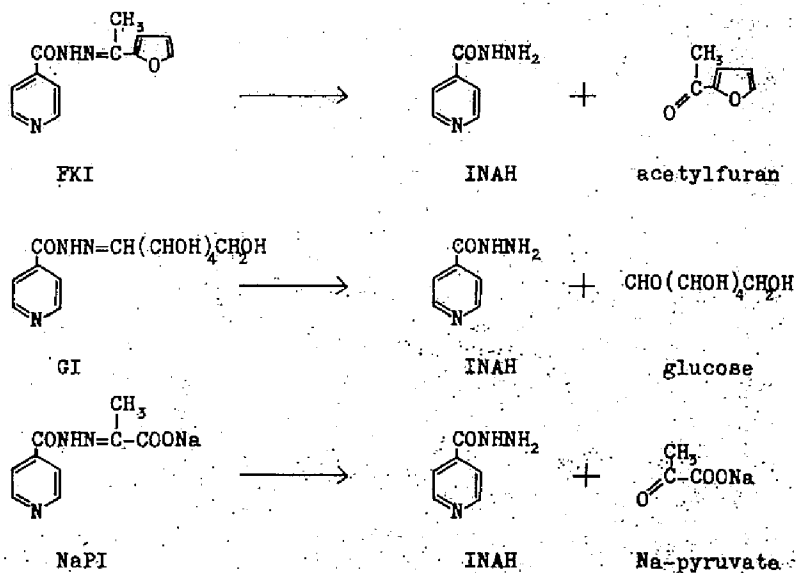
A) Authentic sample, K) Kirchner-, L) Long-, S) Sauton-,
GB) Glycerol broth-, GA) Glycerol agar-, O) Ogawa-medium

Plate, solvent and spray reagent are the same as indicated in Fig. 1

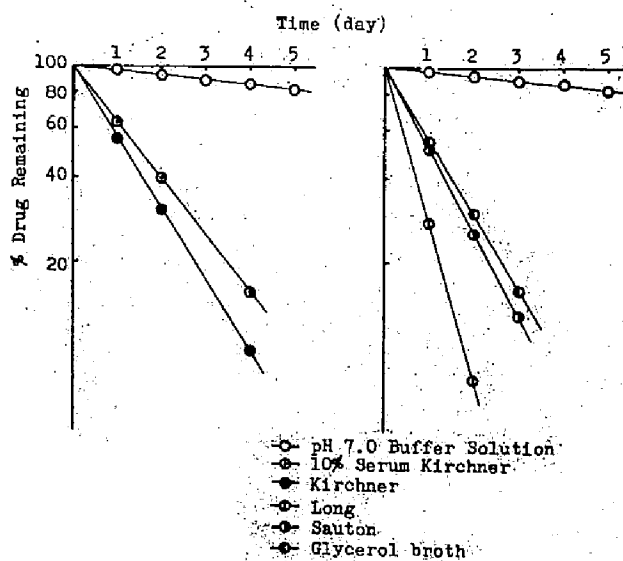
第4図 Thin Layer Chromatoplate of INAH Derivatives and Their Degradation Products in Culture Media

第4図はTLC法により分解反応生成成分を検索したものである。これより、培地中での分解経路は水溶液の場合と同様に INAH のみを生成する加水分解反応であることが判明した。すなわち、水溶液中、培地中を問わず分解は第5図に従って進行することになる。

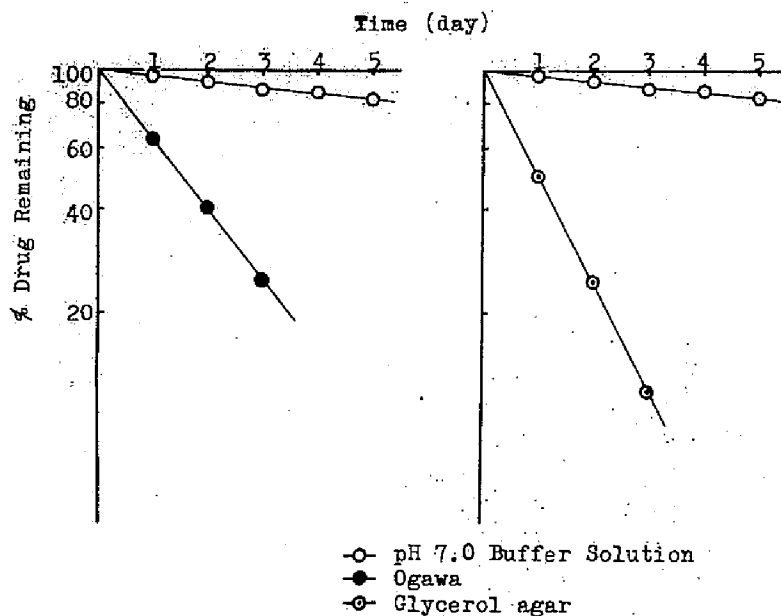
第6図、第7図はそれぞれ液体培地および固体培地中における FK1 の安定性を示し、第8図は GI と NaPI の安定性を示している。分解はやはり擬一次反応速度式に従うことが認められた。



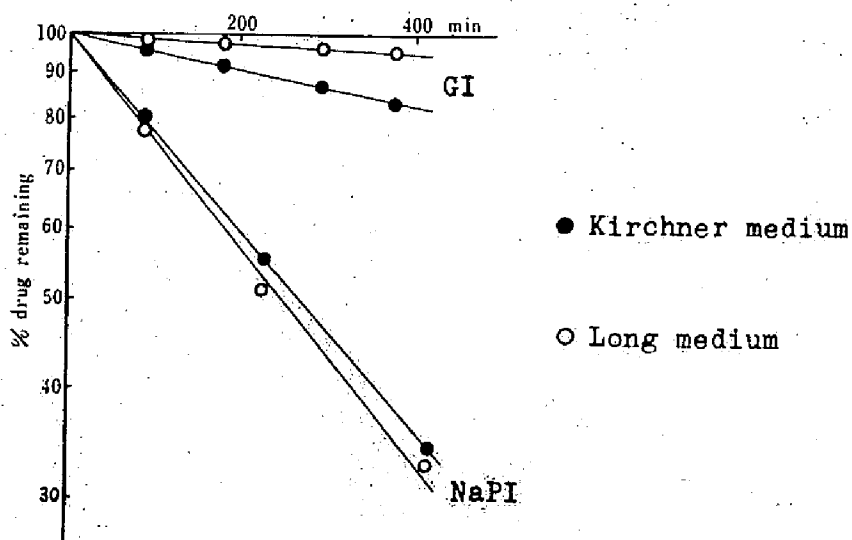
第5圖 Hydrolysis Route of INAH Derivatives



第6圖 Stability of FKI in Liquid Culture Media at 37°



第7図 Stability of FK1 in Solid Culture Media at 37°



第8図 Stability of GI and NaPI in Culture Media at 37°

第1表および第2表は、それぞれ FKI および GI、NaPI に関して算出した k_{app} を半減期 $t_{1/2}$ とともにまとめたものである。FKI は Long 培地において最も不安定となり、いずれの培地でも分解が水溶液中に比べ約10~30倍にも促進された。GI では Kirchner 培地でより速く約4~15倍となり、NaPIでは両培地とも極めて速く約26~28倍にも達した。以上より、I-NAH hydrazone 類は長期にわたる培養期間中にその加水分解が著しく促進され、*in vitro* 抗菌力試験結果に無視しえない影響をもたらすことが十分予想される。

第1表 Apparent Rate Constants and Half-Lives of FKI in Culture Media at 37°

Media	k_{app} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (day)
Kirchner	4.01×10^{-4}	1.20
10% Serum Kirchner	3.32×10^{-4}	1.45
Long	8.75×10^{-4}	0.55
Sauton	5.06×10^{-4}	0.95
Glycerol-broth	4.18×10^{-4}	1.15
Glycerol-agar	4.81×10^{-4}	1.00
Ogawa	3.44×10^{-4}	1.40
Control(pH 7.0)	2.81×10^{-5}	17.1

第2表 Apparent Rate Constants and Half-Lives of GI and NaPI in Culture Media at 37°

Media	GI		NaPI	
	k_{app} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (day)	k_{app} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (day)
Kirchner(pH 7.0)	4.56×10^{-4}	1.06	25.3×10^{-4}	0.19
Long(pH 6.0)	1.23×10^{-4}	3.91	28.6×10^{-4}	0.17
Control(pH 7.0)	2.97×10^{-5}	16.2	9.73×10^{-5}	4.95

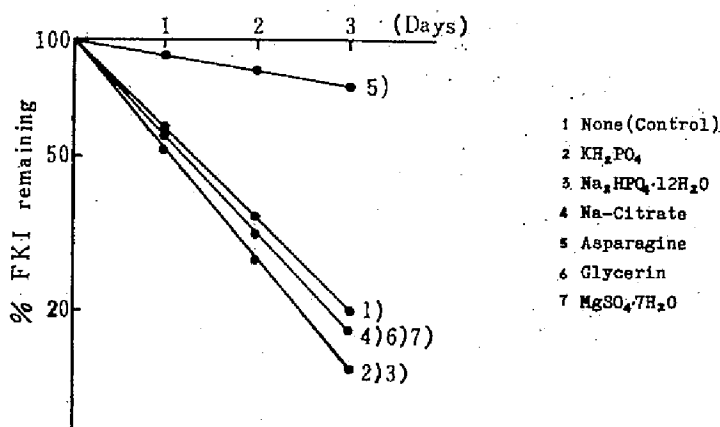
I-1-c 培地中での安定性に影響をおよぼす因子

培地成分のうち加水分解促進因子となるものを知る目的で、薬物として FKI を、培地として

Kirchner 培地を選び検討した。

第9図は各培地成分を交互に除去して安定性を比較したものである。また第3表は k_{app} および $t_{1/2}$ をまとめたものである。

この結果から、asparagine を除去した場合のみ安定性が著しく回復することが認められ、Kirchner 培地中での主要な分解促進因子は asparagine であると考えられる。さらに代替 N 源として Na-glutamate を使用し同様の検討を行った結果、分解促進因子はやはり Na-glutamate であることが明らかとなった。今回使用したいずれの培地にも asparagine などのアミノ酸や卵蛋白質が含まれていることから、INAH hydrazone 類の加水分解促進因子は結核菌の発育に必須なこれらの培地成分であると考えられる。



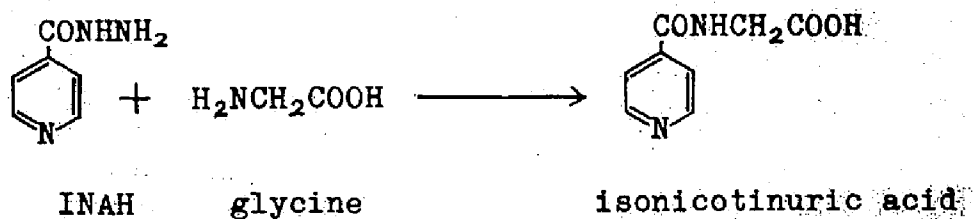
第9図 Effect of Medium Components on the Stability of FKI in Kirchner Medium at 37°

第3表 Apparent Rate Constants and Half-Lives of
PKI in Kirchner Medium at 37°

Excluded Component	$k_{app}(10^{-1} \text{min}^{-1})$	$t_{1/2}(\text{day})$	pH
1) None (Control)	4.01	1.20	6.35
2) KH_2PO_4	4.37	1.10	7.10
3) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	4.37	1.10	6.05
4) Na-Citrate	3.85	1.25	6.25
5) Asparagine	0.642	7.50	6.35
6) Glycerin	3.85	1.25	6.35
7) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.85	1.25	6.35

1-1-d 安定性におよぼすアミノ酸の影響

Wenzel は、中性附近の *in vitro* 条件下で INAH と glycine, asparagine などのアミノ酸との抱合体形成が起こる可能性を示唆している。^{11)~13)} また *in vivo* における抱合体形成に関しても詳細に研究されている。^{14)~17)} 第10図は glycine を一例として示したものである。

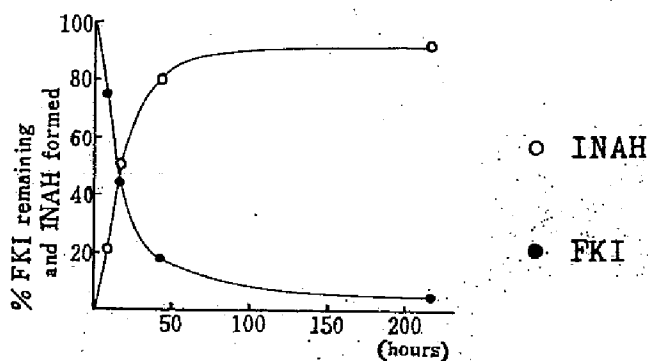


第10図 Formation of Isonicotinuric Acid

そこで安定性におよぼすアミノ酸の影響として、1) 加水分解産物である INAH との抱合体形成、

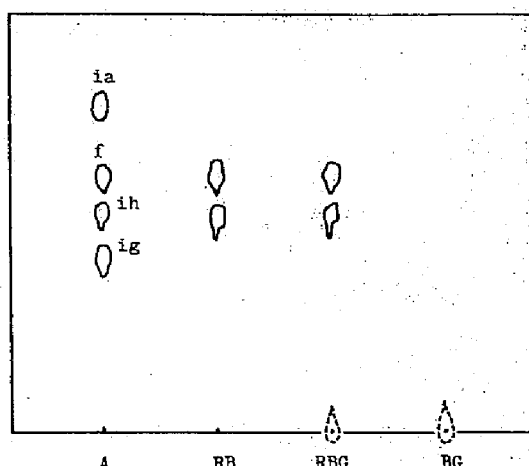
2) 加水分解反応に対する触媒的效果, の二点が考えられる。ここでは FKl および glycine を選び, 1) に関して検討した。

第11図は, イオン交換樹脂を用いる分離定量法により, glycine 添加時の FKl および INAH, glycine 抱合体 (I-Gly), isonicotinic acid (INA) の四者の動態を調べたものである。glycine の添加により FKl の分解が促進され, 分解産物として INAH のみが生じる量を増すだけであり, I-Gly や INA の生成は全く認められなかった。



第11図 Relationship between the Degradation of FKl and the Formation of INAH in 0.05M Phosphate Buffer Solution (pH 6.0) with an Addition of Glycine at 37°

第12図は TLC法により反応生成物について検索した結果である。以上より, アミノ酸の影響は抱合体形成によるものではなく加水分解反応に対する触媒的效果であると予測された。



ia) INA, f) FKI, ih) INAH, ig) I-Gly
 A) Authentic sample, RB) Reaction mixture in buffer soln., RBG) RB with glycine, BG) Buffer soln. with glycine
 Solvent system: Methanol-isopropanol-chloroform(8:1:1)
 Plate and spray reagent are the same as indicated in Fig.1

第12図 Thin Layer Chromatoplate of FKI and Its Reaction Products with an Addition of Glycine at 37°

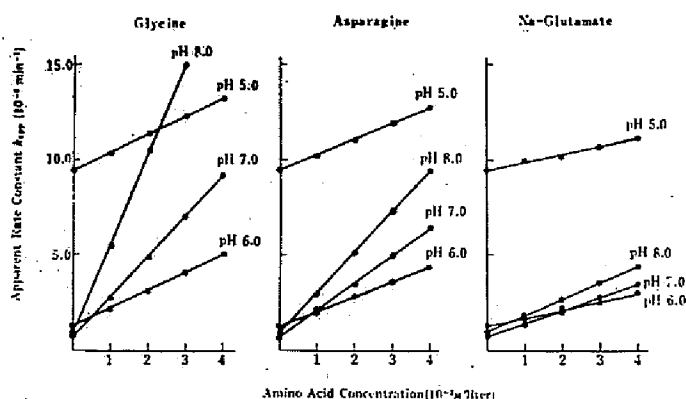
1-1-e. 安定性におよぼす触媒効果

薬物としてFKIを選び、その加水分解におよぼす、1)アミノ酸による触媒効果、2)触媒効果を示す感応基、3)アミン化合物による一般塩基触媒、の三点に関して検討を加えた。

1) アミノ酸による触媒効果

glycineをはじめ三種のアミノ酸を添加してもFKIの分解はすべて擬一次反応速度式に従った。第13図は算出した k_{app} をアミノ酸濃度に対してプロットしたものである。いずれのpHにおいても k_{app} はアミノ酸濃度に対し直線的に増大する関係があることから、これらアミノ酸による触媒効果の存在が明らかとなった。触媒効果を考慮に入れた分解反応速度式は式(1)で与えられる。

$$-\frac{d(FKI)_t}{dt} = k_{app}(FKI)_t = \{k_0 + k_c(A)\}(FKI)_t \quad \cdots(1)$$



第13図 Effect of Amino Acids on the Stability of FK1 in 0.05M Phosphate Buffer Solution at 37°

ここで、 $(FKI)_t$ は時間 t における濃度、 (A) は添加アミノ酸の濃度、 k_{app} はみかけの分解反応速度定数、 k_0 及び k_c はそれぞれ $(A)=0$ ならびに (A) が存在する時の速度定数とみかけの触媒速度定数である。第4表は算出した k_c をまとめたものであるが、いずれの触媒効果も pH の上昇とともに増大し、その大きさは $glycine > asparagine > Na-glutamate$ の順であった。

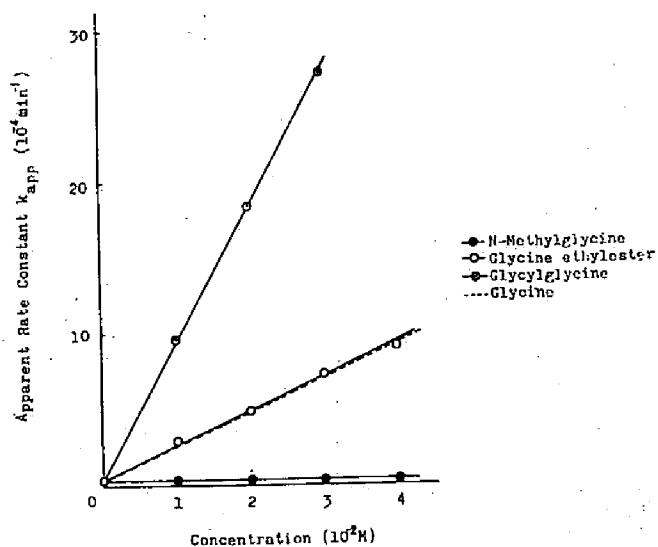
第4表 Apparent Catalytic Rate Constants for the Degradation of FK1 in 0.05M Phosphate Buffer Solution at 37°

pH	Glycine ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)	Asparagine ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)	Na-Glutamate ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)
5.0	9.3	8.3	4.4
6.0	9.4	8.4	4.6
7.0	20.4	13.4	6.9
8.0	47.8	21.0	8.6

2) 触媒効果を示す感応基

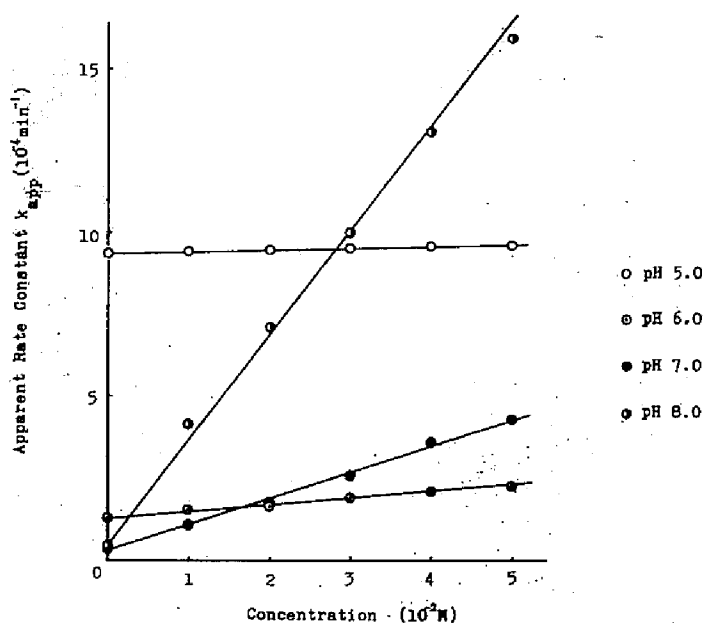
ここではアミノ基およびカルボキシル基が種々置換された glycine 誘導体ならびに alkylamine の一例として methylamine を用いて検討を加えた。第14図および第15図

にその結果を示す。



第14図 Effect of Glycine Derivatives on the Stability of FKI in 0.05M Phosphate Buffer Solution (pH7.0) at 37°

N置換体では触媒効果が全くみられず、一方カルボキシル基置換体である glycine ethylester と glycylglycine ではそれぞれ glycine と同等ないし約 4.5 倍の効果が認められた。また methylamine でもさきのアミノ酸と同様の傾向が得られた。



第15図 Effect of Methylamine on the Stability of FKI at 37°

以上の諸点から、触媒効果を有する特異的な感応基はアミノ基であると考えられ、これを考慮して式(2)が与えられる。

$$-\frac{d(\text{FKI})_t}{dt} = \{k_0 + k_1(\text{B}) + k_2(\text{BH}^+)\}(\text{FKI})_t \quad \cdots (2)$$

ここで、(B)および k_1 は非解離型アミノ基（塩基）の濃度と触媒速度定数であり、 (BH^+) および k_2 は解離型アミノ基（共役酸）のそれらである。

第13図および第15図の結果を式(2)により解析したところ、どの k_2 値も無視し得る程度であり、共役酸の関与はほとんどないものと考えられる。すなわち式(2)は近似的に式(3)で表わされる。

$$-\frac{d(\text{FKI})_t}{dt} = \{k_0 + k_1(\text{B})\}(\text{FKI})_t \quad \cdots (3)$$

3) アミン化合物による一般塩基触媒

系統的知見を得る目的で、さきのアミノ酸の他十数種の化合物に関して触媒効果を検討した。

第5表は算出した k_1 値をまとめたものである。ここで塩基触媒に関するBrönstedの理論式(18)~(20)一般塩基触媒に関しては式(4)、式(5)が成り立ち後者は多価塩基を考慮したものである。

$$k_b = G_b (K_b)^\beta \quad \text{.....(4)}, \quad \frac{k_b}{q} = G_b \left(\frac{P}{q K_a} \right)^\beta \quad \text{.....(5)}$$

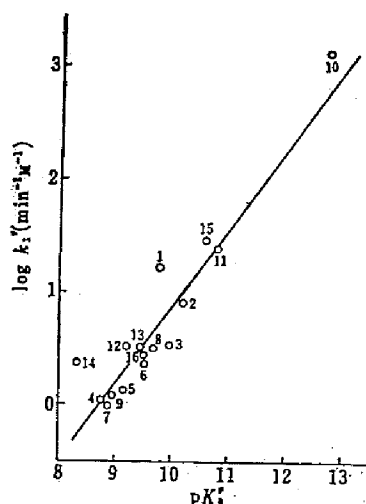
ここで、 k_b は塩基触媒速度定数(= k_1)、 K_a は解離定数(= K_w/K_b)、 q は触媒塩基が有する等価なプロトン受容点の数、 P は共役酸が有する等価な解離するプロトン数であり、 G_b および β は定数である。ここで補正項である k_1/q および $P/q K_a$ をそれぞれ k_1' と $1/K_a'$ に置きかえ対数型に書きかえたと式(6)が得られる。

$$\log k_1' = \frac{\beta}{2.303} pK_a' + \log G_b \quad \text{.....(6)}$$

第16図は第5表の数値に式(6)を適用して表わしたものである。相関係数は $r=0.866$ となりアミノ基による触媒速度定数と塩基性を示す解離定数との間に有意な相関性が認められた。また β 値および G_b 値はそれぞれ0.67、0.35となった。なお図中の番号は第5表のものに対応する。

第5表 Catalytic Rate Constants for the Hydrolysis of FKI in 0.05M Phosphate Buffer Solution(pH7.0) at 37° and Basicities of the Catalysts

No.	Catalyst	k_1 ($\text{min}^{-1}\text{M}^{-1}$)	$\log k_1/q$ ($\text{min}^{-1}\text{M}^{-1}$)	pK_a' ($-\log p/q K_a$)
1	glycine	12.3	1.088	9.78
2	β -alanine	7.49	0.899	10.19
3	L-alanine	3.30	0.518	9.97
4	taurine	1.08	0.033	8.75
5	serine	1.31	0.116	9.15
6	aspartic acid	4.51	0.353	9.52
7	asparagine	0.97	-0.019	8.86
8	glutamic acid	6.24	0.494	9.66
9	glutamine	1.19	0.075	8.96
10	arginine	2600	3.114	12.78
11	lysine	48.2	1.382	10.83
12	histidine	3.29	0.517	9.18
13	tryptophan	3.22	0.508	9.39
14	glycylglycine	2.35	0.371	8.25
15	methylamine	28.8	1.459	10.62
16	ethanolamine	2.09	0.430	9.50



第16図 Brønsted Plot of the Catalytic Rate Constants for the Hydrolysis of FKI at pH 7.0 and 37°

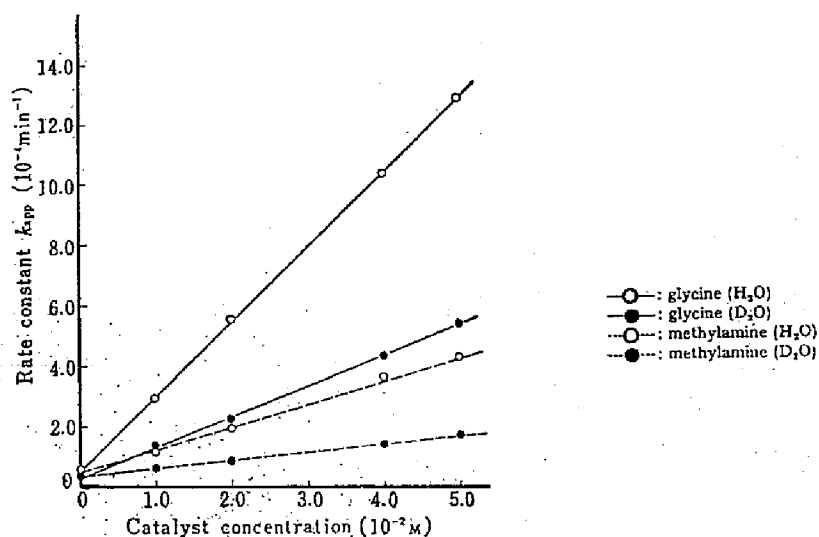
以上の三点から、アミノ酸による INAH hydrazone 類の加水分解促進効果は非解離型アミノ基が一般塩基触媒として特異的に作用することに起因することが明らかとなった。

I-1-f 重水中での触媒効果

一般塩基触媒反応において、重水中と水溶液中での触媒速度定数の比は遷移状態にあるプロトンの位置に関係のあることが知られている²⁾。ここで比 k_{H_2O}/k_{D_2O} は重水溶媒効果と呼ばれ、さきの β 値が 0.1~0.9 となる一般塩基触媒の領域で $k_{H_2O}/k_{D_2O} > 2$ という条件を満たす。

そこで、さきの各種アミン化合物の寄与を確認する目的で重水中における触媒効果を検討した。

第17図は glycine および methylamine に関する結果である。 k_{H_2O}/k_{D_2O} はそれぞれ 2.45, 2.63 となり、一般塩基触媒反応の存在が確認された。

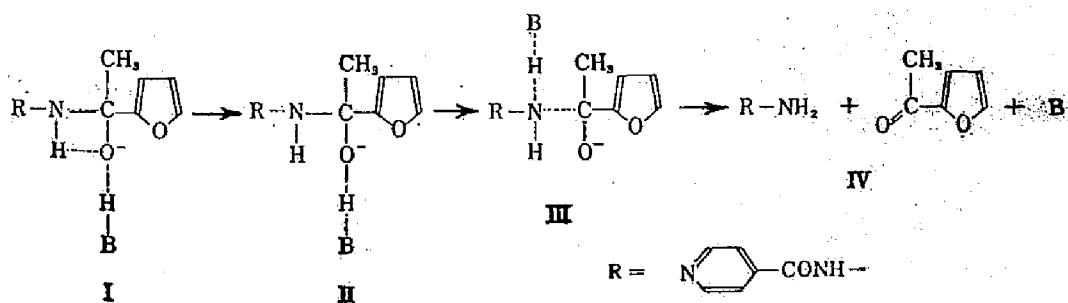


第17図 Deuterium Solvent Isotope Effect for the General Base Catalyzed Hydrolysis of FK1 at pH 7.0 and 37°

I-1-g 培地中での分解の機構

さきに示した結果から、1) 加水分解に關与する水分子のプロトンが塩基触媒に引寄せられ結合しやすいこと、2) その結果プロトン移動が起りやすいことが予想される。^{21), 22)}

第18図はFKIを例として分解機構を考察したものである。



第18図 Proposed Mechanism for General Base Catalyzed Hydrolysis of FK1

すなわち、II→IIIで示される過程において触媒Bによるプロトンの引張りを介してプロトン輸送が行われ、最終的には電子密度の高いN原子がプロトンを受けとりN=C結合の開裂に至るものと考えられる。これらの中間過程は速度論的に把握し得ないものであるが、これまでの結果から律速過程がII→IIIへのプロトン移動であろうと推察される。

I-1-h 考 察

FKI, GIならびにNaPIの三種のINAH hydrazone 類を用いて、種々の結核菌培養培地における安定性およびこれに影響をおよぼす因子に関して検討を行った。培地中での分解は水溶液の場合と同様に見かけ上、擬一次反応速度式に従いINAHを生成する加水分解反応であることが明らかとなった。しかし培地中では、中性附近の水溶液に比べいずれも極めて不安定であり、FKIで約10～30倍、GIで約4～15倍、さらにNaPIで約27倍前後にまで分解が促進された。

この分解促進因子は菌体の発育に必須なN源として含まれているアミノ酸などのアミノ基でありこれが一般塩基触媒として働き水分子のプロトン移動を介するヒドラゾン二重結合の開裂をもたらすという加水分解機構も示唆された。

以上の諸点はisoniazid誘導体の*in vitro* 抗菌活性をはじめその生物活性を適切に評価するうえで極めて重要な問題であり、実際の*in vitro* 抗菌力試験の結果を考察する際に有用な知見になるものと考えられる。

I-2 Isoniazid 誘導体の *in vitro* 抗菌活性

INAHの*in vitro* 抗菌活性に関しては従来から広範な研究がみられ、抗菌作用機序についても多くの可能性が唱えられている。しかし最も有力な説は、菌体膜構成蛋白質の合成を阻害する可能性^{23)～26)}と代謝過程においてvitamin B₆と拮抗する可能性^{27)～29)}の両者であろう。

一方、FKIはhydrazone型のままでINAHの100倍に相当する抗菌活性を有するという報告^{30), 31)}がある他方で全く同等であるとする報告³²⁾もみられるように、INAH hydrazone 類の抗菌活性に関する明確な指針は与えられていない。その最大の要因は、抗菌活性を示す本態がhydrazone型のまゝなのかそれとも加水分解産物であるINAHなのかを確証し得なかったことにあると考えられる。ここでは、すでに述べた培地中での安定性が*in vitro* 抗菌活性といかなる関連にあるかを知るために、牛型結核菌*Bacillus Calmette Guérin* (BCG)を選び抗菌力試験を行った。

1-2-a *in vitro* 抗菌力試験法

抗菌性薬物の力価検定法は、1) 拡散法、2) 希釈法、3) 比濁法の三つに大別されるが、ここでは液体培地における試験を目的としたので主として希釈法を採用した。すなわち、一定量の試験菌を含む培地に各段階の希釈系列で調整された薬液を一定量分注し一定条件にて培養を行った後、菌の発育の有無を判定し最少発育阻止濃度(MIC)により活性を比較できる方法である。また別途に Barclay らの方法³³⁾ に準じて、比濁法により抗菌活性発現における時間的因子に関しても検討した。これは、安定性と抗菌活性との関連を精査する有用な手段である。

1-2-b 最少発育阻止濃度

まず、さきに触媒効果がみられた各種のアミン化合物をN源として培養試験を試みたが、asparagineとglutamate 以外では薬液濃度に関係なく菌の発育が全く認められず培地としては不適であった。これらの点は市川³⁴⁾や庄司ら⁸⁵⁾の結果と一致しており、山村は結核菌が最も有効に同化しうるN源としてasparagineをあげている。³⁶⁾

そこでN源としてasparagineのみを含むKirchner培地およびLong培地を用いて、INAHを対照にして三種のhydrazone類のMICを比較検討した。

第6表 Comparison of Minimal Inhibitory Concentrations of INAH and Its Derivatives against BCG

Compound	MIC (10^{-7} M) ^{a)}	
	in Kirchner Medium ^{b)}	in Long Medium ^{c)}
INAH	8.0	8.0
FKI	8.0	8.0
GI	40.0	120.0
NaPI	8.0	8.0

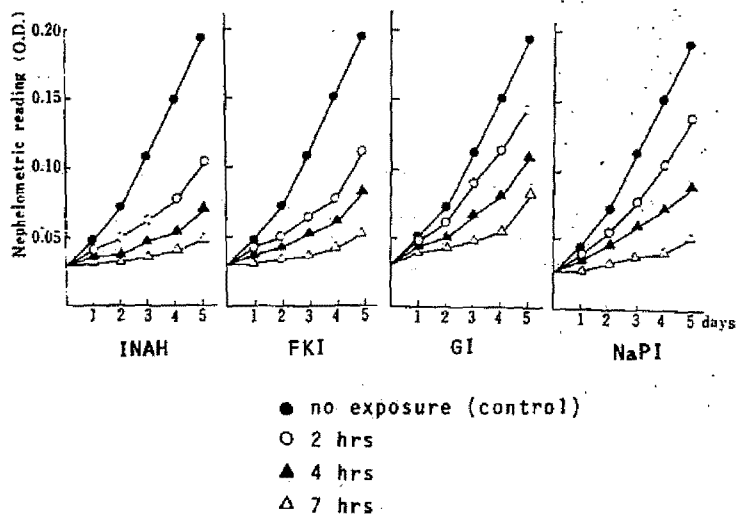
a) Tested in more than triplet

b) and c) Determined after incubation for 14 and 21 days, respectively

第6表はMIC値をまとめたものである。FKI および分解が極めて速いNaPIの抗菌力は INAH と全く同等となり、GI では INAH の $\frac{1}{5} \sim \frac{1}{15}$ にも弱められるが分解の速い培地でより大きくなることが認められた。これらの結果から次の三点が示唆される。第一に、極めて脂溶性に富む FKI は本質的に INAH と等価である。第二に、脂溶性に乏しく hydrazone 型のまゝでは不活性であると考えられる NaPI と GI に関しては安定性の差違がそのまゝ抗菌力に反映する。第三に、抗菌活性の発揮は 2～3 週間という培養期間の比較的初期に完了する可能性がある。

1-2-c 抗菌活性におよぼす時間的因子

Barclay らは INAH の人型結核菌に対する *in vitro* 殺菌効果が約 10 時間程度でほとんど発揮し尽されることを報告している。³⁸⁾ この方法に準じて、薬物-菌接触時間が抗菌活性におよぼす影響に関して検討を加えた。第 19 図は一定時間薬物に接触させた菌の増殖状態を濁度により表わしたものである。FKI と INAH ではほぼ同様の傾向を示すが、GI と NaPI では増殖抑制効果がやゝ小さくなった。



第19図 Effect of Varying Exposure Times on Growth Culture of BCG

培養時間を t とすると対数増殖期にある *BCG* の濃度 N は式(7)で与えられる。

$$N = Qe^{kt} \dots\dots\dots (7)$$

ここで、 Q は $t=0$ における濃度、 k は増殖曲線の勾配を示す定数である。ある一定時間薬物に接触させることにより *BCG* を部分的に死滅させ、さらに培養を続けた検体の m 日後、 n 日後の濃度は式(8)および式(9)で表わされる。

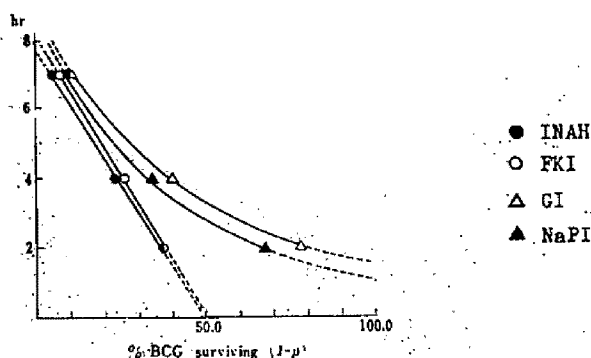
$$N_m = 2pQ + (1-p)Qe^{km} \dots\dots\dots (8)$$

$$N_n = 2pQ + (1-p)Qe^{kn} \dots\dots\dots (9)$$

ここで p は死滅する割合であり、 $2pQ$ なる値は死滅すべき pQ なる濃度が菌の分裂により2倍になること²³⁾を示す。式(8)および式(9)から、 $(1-p)$ すなわち *BCG* の生存率が容易に算出できる。

$$(1-p) = (N_n - N_m) / Q(e^{kn} - e^{km}) \dots\dots\dots (10)$$

すなわち、生存率は接触検体と対照検体の濃度の比から計算できる。第20図は生存率と接触時間との関係をみたものである。



第20図 Relationship between Exposure Time and Percentage of *BCG* surviving after Exposure to INAH and Its Derivatives

FKIおよびINAHでは、瞬間的接触により約50%の殺菌効果が期待された。GIおよびNaPIではこの効果がみられず経時的に殺菌効果が発現した。全体について特筆すべきことは、いずれの薬物でもほぼ8時間程度の接触によりその抗菌活性の大半を発揮しつくすという結果である。

また INAHを用いて接触効果に対する菌令の影響についても検討を加えたが、2～7日間では有意な差が認められなかった。

I-2-d 考 察

さきに述べた安定性と *in vitro* 抗菌活性との関連を知る目的で、INAHを対照として三種の *Hydrazone* 類の抗菌力試験およびこれに影響をおよぼす時間的因子について検討した。

BCGに対するFKIの抗菌活性はINAHと本質的に等価となり、培養期間における安定性が問題とならないが、他方GIおよびNaPIについては安定性の差違すなわち分解によるINAH生成速度の差違がそのまま抗菌活性に反映された。また、いずれの抗菌活性も培養の初期においてほぼ飽和しつつくされることが明らかとなった。

これらの結果は、isoniazid誘導体が結核菌に対し本来殺菌的に作用するものであること⁵⁾から、その効果が培養初期に活性薬物として十分な濃度で存在することによってのみ保証されるという内容を示し、培養期間における安定性の重要性を示唆するものである。

I-3 ま と め

本章では、培養試験が比較的長期にわたる場合について薬物の培地中での安定性と *in vitro* 抗菌力試験との関連を種々検討した。使用した三種のINAH *Hydrazone* は、いずれの培地中でも培地成分により加水分解が著しく促進され、2～3週間という通常の試験期間ではほとんどINAHに分解される。この分解促進因子が主要な培地成分であるアミノ酸などの遊離のアミノ基であることが明らかとなったが、このことは試験菌の発育に必須な培地成分が同時に被検薬物の実質的な力価をも変動させる結果につながることを意味するものである。事実、MIC検定、接触時間の影響などの検討結果から明らかなように、アミノ酸などの培地成分によって支配される培養初期の活性薬物の有効濃度が抗菌力を決定する主要因であることが証明された。

本章での結果は、長期の培養試験を必要とする結核菌および抗結核剤などの抗菌活性の評価に対して新たな指針を与えるのみならず、アミノ酸など培地成分が支配的因子となりうるという点から考えて、他の培養条件あるいは培地成分に対しても同様の留意が必要となることを示唆するものである。

第Ⅱ章 Penicillin 誘導体の安定性と *in vitro* 抗菌活性におよぼす銅イオンの影響

培養試験においては、アミノ酸などのN源や glucose などのC源が必要であると同時に、特別な金属イオンを必要とする場合もある。この際、前章での結果からも明らかなように、培養条件における試験薬物の安定性を正確に予知し評価することが極めて重要な問題となる。

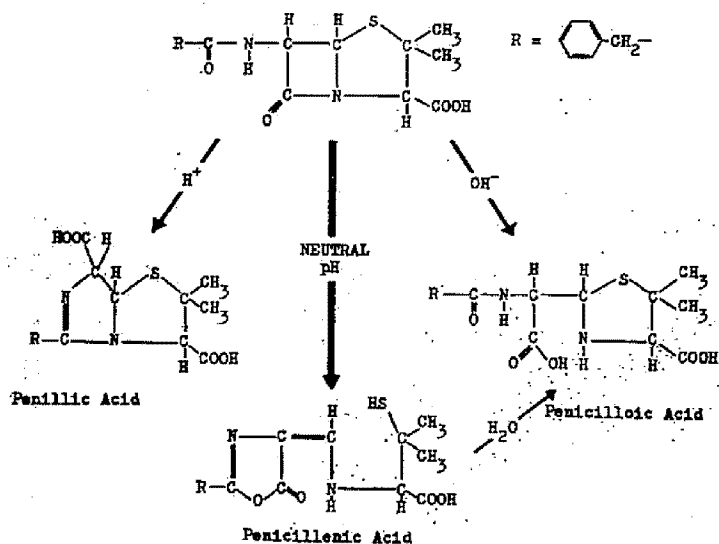
本章では、微量金属イオンが必要とされる培養条件における抗菌性薬物の安定性と *in vitro* 抗菌活性との関連を主要な検討課題とし、生化学的にも重要視されている銅イオンおよびこれとの相互作用が予想される penicillin 誘導体に着目した。penicillin 誘導体の水溶液中での安定性に関しては多岐にわたる報告が見られるが^{37)~55)}、培養条件における安定性を検討した例はほとんど見当たらない。この点に若干の関連性を有するものは、penicillinase 類似の加水分解触媒に関する Schwartz らの報告^{46)~49)} および銅イオン共存下での加水分解反応に関する Niebergall らの報告^{50)~52)} のみである。しかし従来の報告は生物学的定量法を主とするなどの点から、水溶液中での分解速度や分解機構についてさえも十分であるとは言い難い。そこで本章では、薬物として水溶液中での分解が予想される benzylpenicillin (BP) および 2,6-dimethoxyphenylpenicillin (DMP) を選び、グラム両性菌の培養試験に常用されるリン酸ブイオンを培地として用い、化学的定量法により培地中での安定性および *Staphylococcus aureus* に対する *in vitro* 抗菌活性におよぼす銅イオンの影響を明らかにする目的で検討を行った。

Ⅱ-1 Penicillin 誘導体の安定性におよぼす銅イオンの影響

Schwartz らによると penicillin 誘導体は pH 6.5 の中性付近で最も安定であるとされている。⁴⁰⁾ また Niebergall らは銅イオン添加によりアルカリ分解産物である penicilloic acid の生成が促進されることを報告している。^{50)~52)} しかし、実際の抗菌力試験培地を用いて安定性の検討をした例は全く見当たらない。ここでは、リン酸ブイオン培地における安定性におよぼす銅イオンの影響に関して詳細に検討し、主として反応速度論的手法を応用して考察を加えた。

Ⅱ-1-a 分解産物の同定

Schwartz ら⁴⁰⁾ は、BP に関する主要な加水分解経路を第21図の様式で示している。



第21図 Major Degradative Reaction of Benzylpenicillin

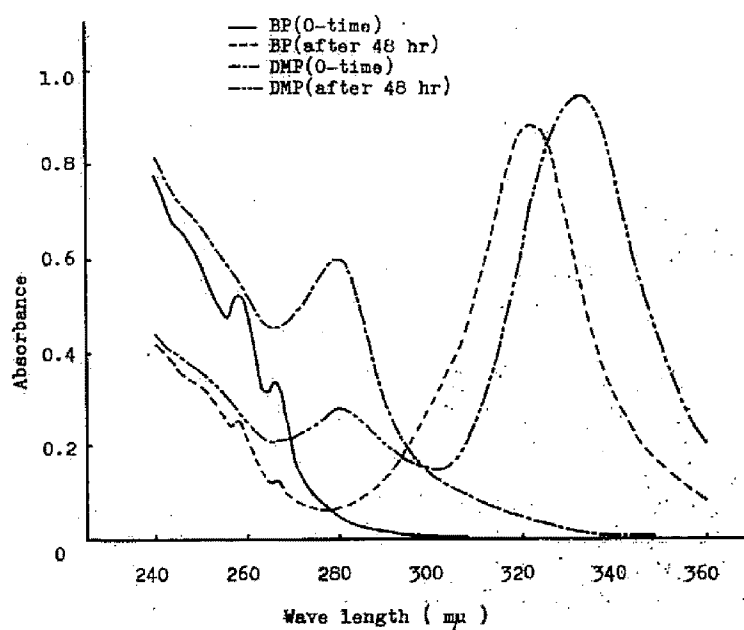
すなわち、酸性・中性・アルカリ性領域でそれぞれ penillic acid, penicillenic acid, penicilloic acid 同族体に分解されると考えられている。ここでは、BP および DMP の水溶液中ならびに培地中における分解産物を TLC 法により検索した。

第22図はこの結果を示したものであり、各標品の EA および OA による表示はそれぞれ penicillenic acid, penicilloic acid 同族体を表わす。銅イオンの有無にかかわらず、分解産物は penicillenic acid 同族体のみであり、Niebergall らが報告している penicilloic acid 同族体^{50)~52)}は全く認められなかった。

1') BP, 2') BPER, 3') BPOA, 1'') DMF, 2'') DMER, 3'') DMPA
A) Authentic sample, R₁) Reaction mixture without Cu²⁺, R₂) Reaction mixture with Cu²⁺, B) Broth blank

Plate: Silica gel G (Merck) 25g/50ml, dried(100°, 30min)
Solvent system: Organic phase of isooxyl acetate-methanol-formic acid-water(65:20:5:10)
Spray reagent: Mixture of aqueous solutions of 10% FeCl₃, 5% K₃Fe(CN)₆, and 20% Na₂SO₄ (2:1:7)

第23図は BPEA と DMPEA の吸収スペクトルを示したものである。前者は文献値⁴⁰⁾と等しく 322 mμ に最大吸収波長 (λ_{max}) を示し、後者は 332 mμ に示した。培地中でも全く同様の結果であり、反応時間の経過とともに BPEA および DMPEA の吸光度が増加するのみで一定時間後に最大値となり、以後変化しないことが認められた。従って、以下の検討は BPEA および DMPEA の吸光度測定により行った。

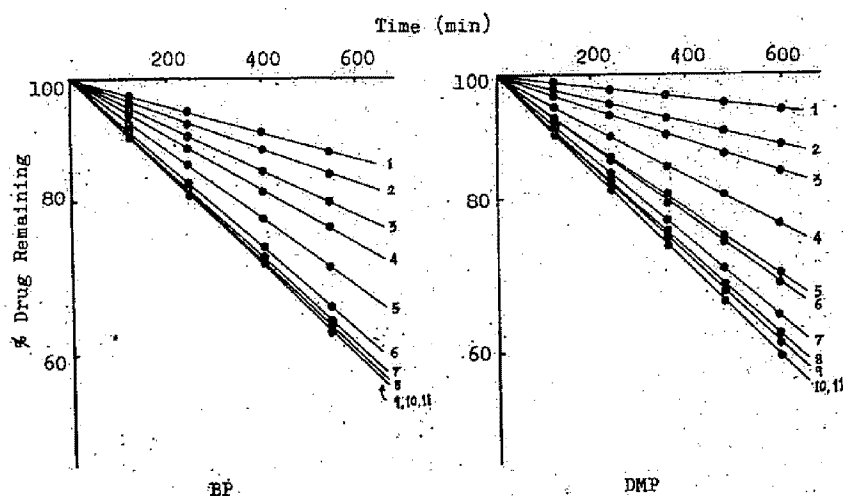


第23図 Absorption Spectra of BP, DMP and Their Degradation Products in 0.05M-Phosphate Buffer Solution (pH 5.0)

II-1-b 水溶液中での安定性

ここでは、安定性が比較的保たれると予想される pH 5.0 のリン酸緩衝液を使用した。

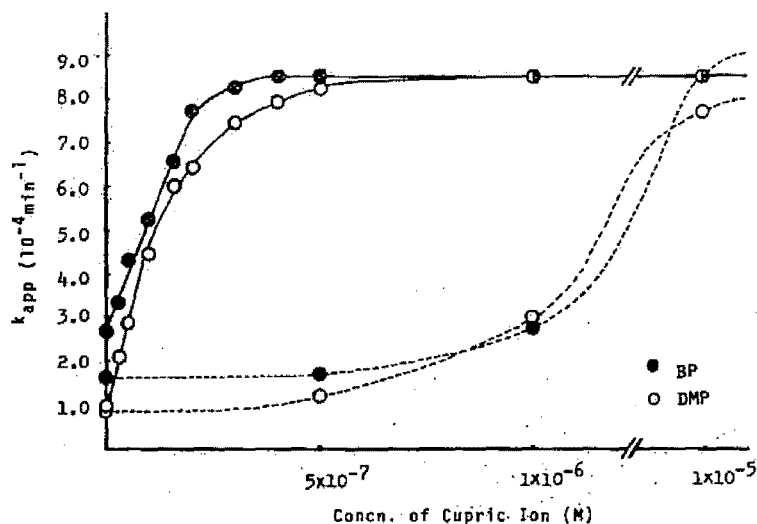
第24図は BP, DMP の安定性を見たものである。いずれの薬物も、加水分解は銅イオンの濃度に関係なく擬一次反応速度式に従い、その速度は銅イオンにより著しく促進されることが明らかとなった。



Concentration of added Cu^{2+} (M): 1) 0, 2) 3×10^{-7} , 3) 5×10^{-7} , 4) 1×10^{-6} ,
 5) 1.6×10^{-6} , 6) 2×10^{-6} , 7) 3×10^{-6} , 8) 4×10^{-6} , 9) 5×10^{-6} , 10) 1×10^{-5} , 11) 1×10^{-5}

第24図 Stability of Penicillins in pH 5.0 Buffer Solutions at 37°

第25図は算出された見かけの速度定数 k_{app} と銅イオンの濃度との関係を示したものである。銅イオンの低濃度領域では両者に比例関係が見られるが、高濃度領域では飽和現象に類似した傾向となり、速度定数がほぼ一定値に達した。なお点線は次に述べる培地中での結果の一部を示したものである。



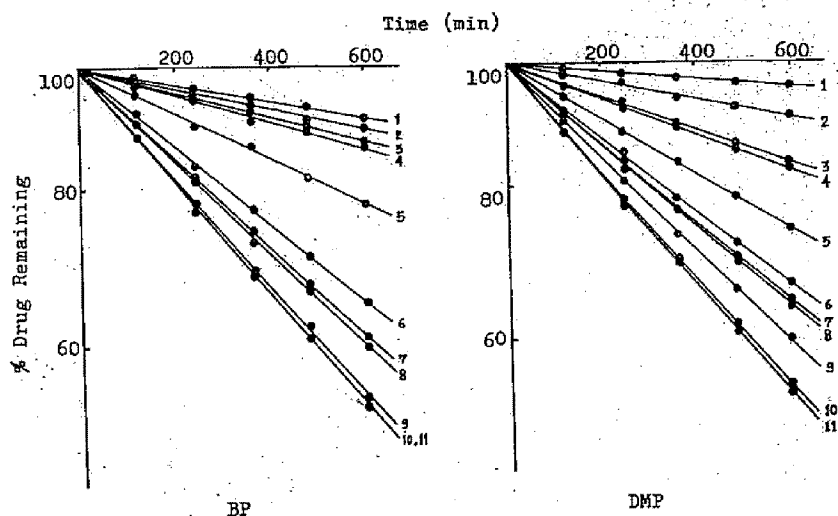
第25図 Effect of Cupric Ion Concentration on the Stability of BP and DMP in Phosphate Buffer Solution (pH 5.0) at 37°

II-1-c 培地中での安定性

pH 5.0に調整したリン酸ブイオンを用いて銅イオンの影響を検討した。第26図は安定性の結果を示したものである。分解はやはり擬一次反応速度式に従い、銅イオンにより促進されることが明らかになった。

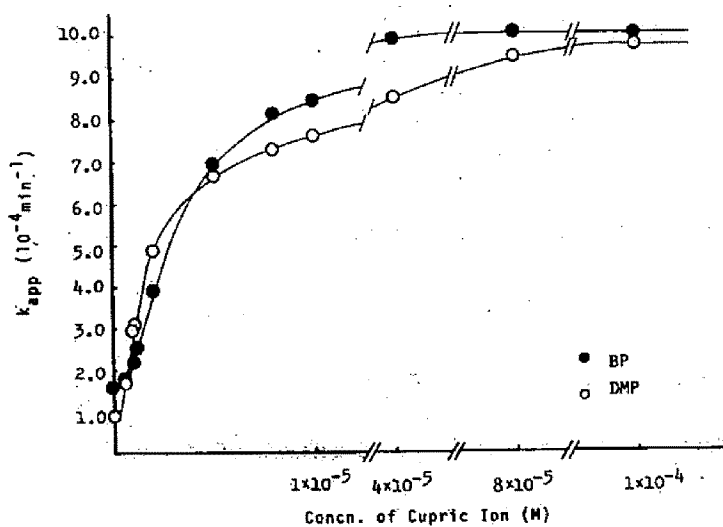
第27図は速度定数と銅イオン濃度との関係をみたものである。水溶液中での結果と比較すると分解速度定数の直線的増加はかなり高濃度側へあらわれるが、一定値に達する傾向は全く類似した。

以上の結果から、BPおよびDMPの安定性におよぼす銅イオンの影響に関して以下の諸点が要約される。第一に銅イオンが相対的に低濃度の場合（緩衝液中で $0 \sim 3 \times 10^{-7}$ M, 培地中で $5 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-8}$ M）には、加水分解の促進が主として触媒的効果によるものであると考えられる。第二に高濃度領域では、薬物と銅イオンとの複合体（錯体）形成が予想される。第三に培地中では銅イオンと他の培地成分との間に相互作用が存在するものと考えられる。以下、これらの点に関して検討を加えた。



Concentration of added Cu^{2+} (M): 1) 0, 2) 5×10^{-7} , 3) 8×10^{-7} , 4) 1×10^{-6} , 5) 2×10^{-6} , 6) 5×10^{-6} , 7) 8×10^{-6} , 8) 1×10^{-5} , 9) 4×10^{-5} , 10) 8×10^{-5} , 11) 1×10^{-4}

第26图 Stability of Penicillins in pH 5.0 Broth at 37°



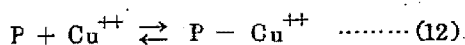
第27图 Effect of Cupric Ion Concentration on the Stability of BP and DMP in Phosphate Broth (pH 5.0) at 37°

II-1-d 銅イオンの触媒効果および複合体形成効果

ここでは、さきの結果に関して反応速度論的手法により解析を試みた。銅イオンによる触媒効果および複合体形成効果を考慮に入れた加水分解反応速度式は次のように表わせる。

$$-\frac{d(P)_t}{dt} = k_{app}(P)_t \\ = k_o(P)_t + k_{Cu^{++}}(Cu^{++})_f(P)_f + k_c(P)_c \dots\dots\dots(11)$$

ここで、 k_o 、 $k_{Cu^{++}}$ 、 k_c はそれぞれ銅イオンを添加しない時の分解速度定数、銅イオンによる見かけの触媒速度定数および複合体の分解速度定数を、 $(P)_t$ 、 $(P)_f$ 、 $(P)_c$ はそれぞれ時間 t における penicillin の全濃度、遊離型の濃度および複合体の濃度を、また $(Cu^{++})_f$ は遊離の銅イオンの濃度を示す。銅イオンの高濃度領域において k_{app} は一定値を示し、かつ広範囲にわたり変化しないことから、すでに報告されている化学量論的に 1 対 1 の複合体形成^{51), 56)} を仮定することができる。すなわち、式(12)が考えられる。



ここで、銅イオンの全濃度を $(Cu^{++})_t$ とおくと、式(11)は式(13)のように表わされ、 $(P)_c \ll (P)_t$ 、 $(Cu^{++})_t$ なる条件では式(14)により $(P)_c$ が近似的に求められる。

$$(k_{app} - k_o)(P)_t = k_{Cu^{++}}\{(Cu^{++})_t - (P)_c\}\{(P)_t - (P)_c\} + k_c(P)_c \dots\dots\dots(13)$$

$$(P)_c = \frac{k_{app} - k_o - k_{Cu^{++}}(Cu^{++})_t}{k_c - k_{Cu^{++}}(P)_t} (P)_t \dots\dots\dots(14)$$

さらに、式(12)から見かけの複合体形成定数 K_{app} は式(15)で与えられる。

$$K_{app} = \frac{(P)_c}{\{(P)_t - (P)_c\}\{(Cu^{++})_t - (P)_c\}} \dots\dots\dots(15)$$

式(14)におけるすべての定数項、濃度項とも測定値および実験条件から算出可能であり、ここで求めた $(P)_c$ を式(15)に代入することにより K_{app} が求められる。種々の $(Cu^{++})_t$ に関して上記の理論式が満足されるので、仮定および解析は妥当なものであると考えられる。なお、培地中での結果に関しては、 $(Cu^{++})_t$ の代りに便宜上 $\{(Cu^{++})_t - 5 \times 10^{-7}\}$ なる値を用いた。

第7表は各定数を一括したものである。いずれの定数も DMP の方が大きいことから、より銅イオンの影響を受けやすいと考えられる。

第7表 Rate Constants and Apparent Stability Constants for the Reaction System of Penicillins and Cupric Ion at pH 5.0 and 37°

	BP		DMP	
	Buffer Soln.	1/10-Broth	Buffer Soln.	1/10-Broth
k_o (min ⁻¹)	2.73×10^{-4}	1.62×10^{-4}	1.00×10^{-4}	0.897×10^{-4}
k_{cat} (min ⁻¹ M ⁻¹)	2.52×10^3	1.42×10^2	3.43×10^3	4.50×10^2
k_c (min ⁻¹)	5.81×10^{-4}	8.39×10^{-4}	7.49×10^{-4}	8.78×10^{-4}
K_{app} (M ⁻¹)	4.51×10^2	4.73×10^2	8.15×10^2	19.6×10^2
Log K_{app} (M ⁻¹)	2.65	2.67	2.91	3.29

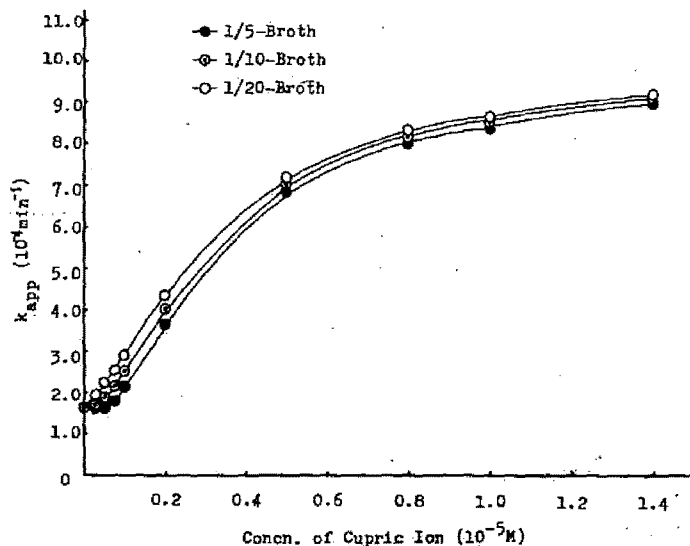
また、水溶液と培地との比較から、複合体の分解速度において大差は見られないが、触媒速度定数に有意な差があり、培地中では触媒的加水分解がやゝ起り難いものと考えられる。

BPのlog K_{app} に関してNiebergallら⁵²⁾、Weissら⁵⁶⁾はそれぞれ2.63、4.8という値を得ているが、実験条件や解析方法などに大きな差異があるためそのまゝ比較の対象にはなり得ない。

11-1-e. 銅イオンの効果におよぼす培地成分などの影響

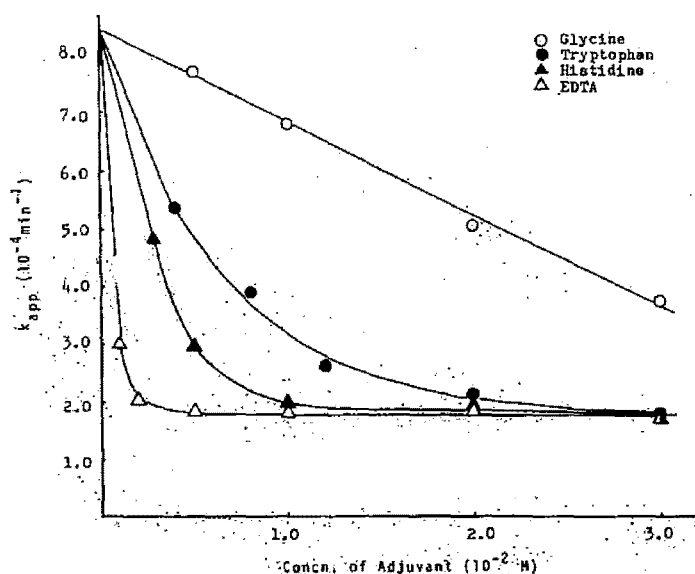
まず塩濃度を一定にした各種のリン酸ブイオンを用いて検討を加えた。第28図はさきの結果と同様に k_{app} と銅イオンの濃度との関係をみたものである。銅イオンの触媒的効果の発現は培地蛋白質の濃度の増加とともに高濃度側に移ることが明らかとなった。

この傾向は主として培地蛋白質の構成アミノ酸などによると考えられたので、銅イオンと錯体生成能に差のある三種のアミノ酸および ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を選び検討を加えた。



第28図 Effect of Broth Concentration on the Stability of BP in the Presence of Cupric Ion at pH 5.0 and 37°

第29図は銅イオンの初濃度を一定 ($1 \times 10^{-6} M$) とし、相互作用が予想される四種を添加した時の k_{app} を示している。これら四者のいずれも分解におよぼす銅イオンの影響を軽減することが認められ、この傾向は従来から報告されている錯体生成定数の大小関係とよく一致する。^{57)~60)}



第29図 Effect of Cupric Ion Complexing Agents on the Stability of BP in Phosphate Buffer Solution (pH 5.0) at 37°

II-1-f. 考 察

緩衝液および培地中におけるBP, DMPの安定性におよぼす銅イオンの影響に関して検討した。

いずれの条件においても分解は銅イオンの濃度とは無関係に見かけ上擬一次反応速度式に従う加水分解反応であり、分解産物は penicillenic acid 同族体のみであることが明らかとなった。また銅イオンはその低濃度領域、高濃度領域でそれぞれ触媒効果および複合体形成効果が支配的となり、この加水分解反応を著しく促進することが判明した。同時に、培地成分である蛋白構成アミノ酸類が銅イオンの効果に対して抑制的に作用することも認められた。反応速度論的解析を加えた結果、触媒速度定数および複合体形成定数の算出が可能となり、DMPの方が銅イオンの影響を受けやすくやゝ不安定であることが示唆された。penicillin 誘導体と銅イオンとの複合体形成に関しては、 β -ラクタム環のOと側鎖のNとの間で錯体形成を行いその結果環の開裂をもたらす機構が報告されているが、^{52), 56), 61)}この点についての詳細な検討は省いた。従来、銅イオンは酵素触媒反応や錯体形成反応などに関与し、生物学的に活性を有する極めて重要な金属イオンの一

つであるとされ、ここで得られた知見は penicillin 誘導体などの抗菌活性を適切に評価するうえで無視し得ない要因であると考えられる。

Ⅱ-2 Penicillin 誘導体の *in vitro* 抗菌活性におよぼす銅イオンの影響

penicillin 誘導体の *in vitro* 抗菌活性に関する数多い報告のなかで、近年ようやくその作用機序が解明されつつある。最も有力な説は、菌体膜構成分子の mucopeptide 鎖における cross-linking の際おこなわれる transpeptidation を阻害する可能性である。⁶²⁾ ~68) Wick は類縁化合物である cephalothin に関して安定性と抗菌活性との関係を論じているが、⁶⁹⁾ 定量的知見に乏しいものである。また氏は銅イオンの共存により抗菌力が見かけ上短時間で減少することを報告している。^{70), 71)} しかし、培地中での安定性と *in vitro* 抗菌活性との関連性におよぼす銅イオンの影響を系統的に検討した例は見当たらない。

ここでは、さきに明らかにした銅イオンの影響が実際の *in vitro* 抗菌力試験の結果にどのような効果をもたらすかを知る目的で、試験菌として *Staphylococcus aureus* FAD-209 P-sensitive を用いて前章と同様の検討を行った。

Ⅱ-2-a 最少発育阻止濃度の検定

第8表は銅イオンを種々の濃度で添加した培地中における MIC 値を示したものである。添加銅イオンの低濃度領域では抗菌力の低下が見られるが、比較的高濃度になると無添加の対照値とほぼ等しくなった。また銅イオンの有無にかかわらず認められる両薬物間での差異は、従来報告されている結果とよく合致する。⁷²⁾ penicillenic acid 同族体は抗菌活性を全く有しないこと⁴⁰⁾ から、安定性の差異が抗菌活性に反映されているという論証として、第一に時間的因子の寄与、第二に添加銅イオン自身による抗菌活性の有無、第三に複合体形成による菌細胞壁への透過性に対する影響などを知る必要がある。

第8表 Comparison of Minimal Inhibitory Concentrations of Penicillins against *St. aureus*

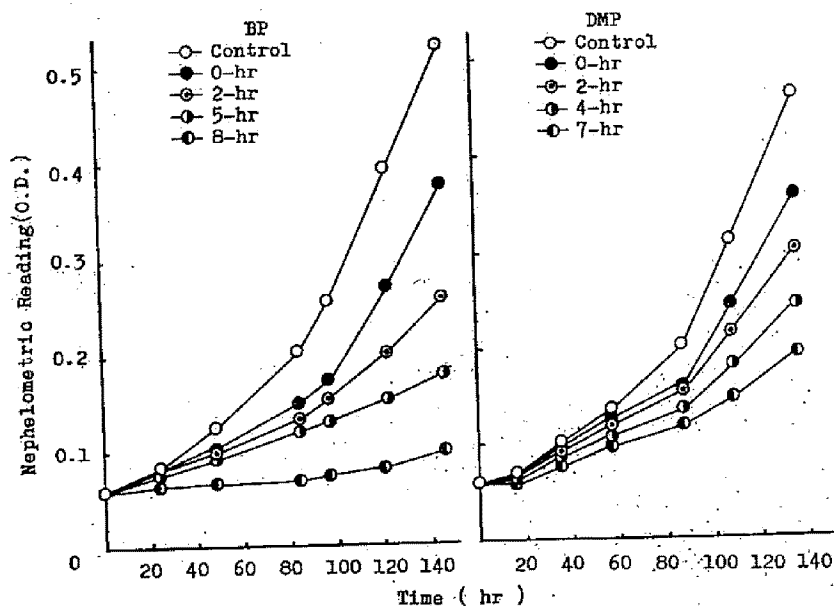
Added Concn. of Cupric Ion (M)	MIC (10^{-7} M)	
	BP	DMP
0	4.0	200
10^{-9}	10	400
10^{-8}	20	600
10^{-7}	4.0	200
10^{-6}	4.0	200
10^{-5}	4.0	100

II-2-b 抗菌活性におよぼす時間的因子

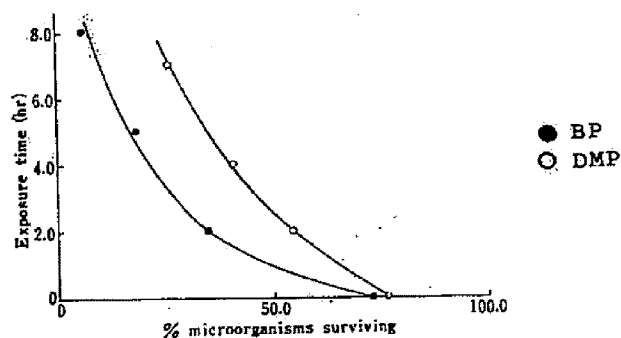
第30図は前章と同様にして薬物に一定時間接触させた菌体の増殖曲線を示したものである。

BPの方にやゝ強い殺菌効果が認められた。ここで式(10)から生存率を求め、接触時間との関係を第31図に示した。前章のINAHやFKIと異なり、BP、DMPでは瞬間的接触でもそれぞれ73%、76%もの生存率を示した。

しかしこれらの場合にも、7～8時間程度の培養初期に抗菌活性の大半を発揮することが認められた。また、菌令の差異による影響はほとんど見られなかった。



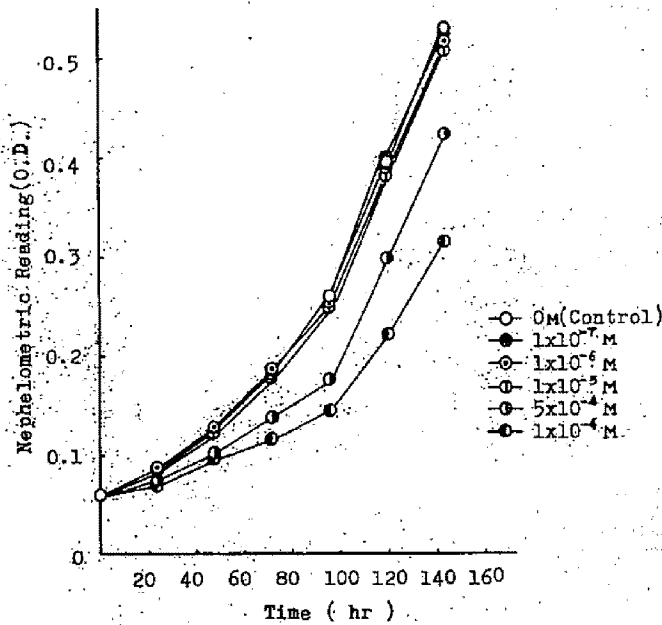
第30图 Effect of Varying Exposure Times on Growth Culture of *St. aureus*



第31图 Relationship between Exposure Time and Percentage of *St. aureus* surviving after Exposure to Penicillins

II-2-c 銅イオンの抗菌活性

薬物を含まない条件で銅イオンの各種濃度溶液を調整し、これの抗菌活性を比濁法により検討した。第32図は増殖曲線を示し、第9表は式(10)により算出した生存率から求めた発育阻止率を示したものである。



第32図 Effect of Cupric Ion on Growth Culture of *St. aureus*

第9表 Percentage of Growth Inhibition of
Staphylococci Subjected to Cupric Ion

Concn. of Cu^{++} (M)	% Growth Inhibition
1×10^{-7}	0
1×10^{-6}	0.74
1×10^{-5}	1.7
5×10^{-5}	10.3
1×10^{-4}	43.7

銅イオンをかなり高濃度に添加した場合には抗菌活性を示すが、さきの MIC 検定の際に用いた濃度範囲ではほとんど活性を有しないことが確かめられた。

II-2-d 複合体形成による脂溶性の増加

最近, Biagiらは penicillin誘導体および cephalosporin誘導体の *St. aureus* に対する抗菌活性が脂溶性の高いものほど大きくなることを報告している。⁷⁸⁾ ここでは銅イオンが共存し、加水分解促進効果がほゞ抑えられる条件で、脂溶性と抗菌活性との関係を考察するために緩衝液—isoamyl alcohol 系での分配係数を測定した。第10表にその結果を示した。

銅イオンの添加により分配係数は著しい増加を示し、概して DMP の方がその効果は大となった。この点は、さきに示した第7表における $\log K_{app}$ の結果によく適合するものである。またこの結果から、薬物と銅イオンとの複合体形成により菌細胞壁への透過性の増大が期待される。

第10表 Effect of Cupric Ion on the Apparent Partition Coefficient of Penicillins to Isoamyl Alcohol at 5°

Concentration of added cupric ion (M)	BP (ratio)	DMP (ratio)
0	0.410 (1.00)	0.394 (1.00)
1×10^{-4}	0.431 (1.05)	0.435 (1.10)
1×10^{-3}	0.467 (1.14)	0.456 (1.16)
1×10^{-2}	0.690 (1.68)	0.868 (2.20)
3×10^{-2}	1.125 (2.74)	1.572 (3.99)
5×10^{-2}	1.833 (4.47)	2.194 (5.57)

II-2-e 考 察

さきに論じた培地中での安定性におよぼす銅イオンの影響が実際の *in vitro* 抗菌力試験の結果に対しいかなる関連を有するかを知る目的で、種々の検討を行った。MIC を検定した結果、低濃度領域において抗菌力が減少し、比較的高濃度側では無添加の対照値にほゞ等しくなった。また、BP は DMP の約50倍の抗菌活性を有することが確かめられた。これらの抗菌活性は前章の結果によく類似しており、培養の初期においてその大半を発揮することが明らかとなった。さらに銅イオン自身による抗菌活性はここでは無視することができ、むしろ薬物との複合体形成により脂溶性が増大することから、菌細胞壁への透過性の増大すなわち抗菌活性の増大が予測された。

以上の諸点から、BP および DMP の安定性の差異は銅イオンの低濃度領域において抗菌活性に

反映されることが明らかとなったが、全体的にはこの安定性の差異が同時に期待される菌細胞壁への透過性の増大の程度とバランスを保ちつつ、*in vitro* 抗菌力試験の結果に反映されるものと考えられる。

Ⅱ-3 ま と め

本章では、培地成分として微量金属イオンを必要とする培養条件における抗菌性薬物の安定性と *in vitro* 抗菌活性との関連を主要な検討課題とし、そのモデルとして penicillin 誘導体および銅イオンを選んだ。いずれの薬物も各種濃度の銅イオンの共存により加水分解が著しく促進され、低濃度領域および高濃度領域でそれぞれ銅イオンによる触媒効果ならびに複合体形成効果が支配的となった。また使用した培地中の蛋白成分の構成アミノ酸類がこれらの銅イオン効果に対して抑制的に作用することも示唆された。前章での結果と同様に、penicillin 誘導体の *in vitro* 抗菌活性は培養初期の力価に依存することが明らかとなり、主として銅イオンに支配される培地中の安定性に由来する複雑な影響が *in vitro* 抗菌力試験の結果に反映されることも確かめられた。

すなわち、銅イオンの低濃度領域においては触媒効果による有効濃度の減少が力価の低下として、また高濃度領域では逆に脂溶性の複合体形成による菌細胞壁透過性の増大が力価の上昇に反映するという結果が得られた。

このように、金属イオンなどの特殊な培地成分も前章で述べたアミノ酸や蛋白質などと同様、培養初期における試験薬物の力価を本質的に変動させうる場合があり、本章で得られた知見は抗菌活性の適切な評価に対して重要な指針の一つになると考えられる。

第Ⅲ章 Nitrofuran 誘導体の菌体共存下での消失挙動と

in vitro 抗菌活性

抗菌性薬物の培養条件における安定性および抗菌活性の問題を論ずる際、前章までに述べた培地成分のみによる影響と同時に、試験菌自身による影響およびこれに対する培地成分の効果などに関しても明らかにする必要がある。

そこで本章では、培地成分のみによる不活性化がほとんど無視しうるにもかかわらず、菌体共存という培養条件下で培養液からの特異的に速い消失現象が予想される nitrofuran 誘導体に着目した。このものは *in vitro* において広範な抗菌スペクトルと強力な活性を有するが、難溶性、毒性、副作用などの欠点のためかなりの制限を受けている。最近、水溶液中や生体成分などを含む培養条件下での安定性が注目され、かなりの研究報告も見られるが、^{74)~79)} 菌体共存という実際の培養条件における培地中からの消失挙動に関する知見は全く得られていない。

本章では、菌体共存という培養条件下での消失挙動の本態およびこれにおよぼす培地成分などの影響を明らかにするとともに、これと *in vitro* 抗菌活性との関連を知る目的で数種の誘導体に関して基礎的な検討を行った。なお、試験菌には前章と同じ感受性株の他、耐性株である *St. aureus* 209P Jc-1 Fz25-resistant も使用した。

Ⅲ-1 Nitrofuran 誘導体の菌体共存下での消失挙動

Asnisが *E. coli* の cell-free extract による 5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone の還元的分解に関する報告⁷⁴⁾を出して以来、nitrofuran 誘導体の代謝分解の解明にむけて少なからぬ研究が行われているが、^{75), 76), 78)~83)} SH残基による還元的分解の可能性が示唆されている。^{80)~83)}

ここでは第11表に示す薬物の消失挙動を比較検討するとともに、この主要な因子として予想される菌体による薬物の取りこみおよび代謝分解についても精査を加えた。

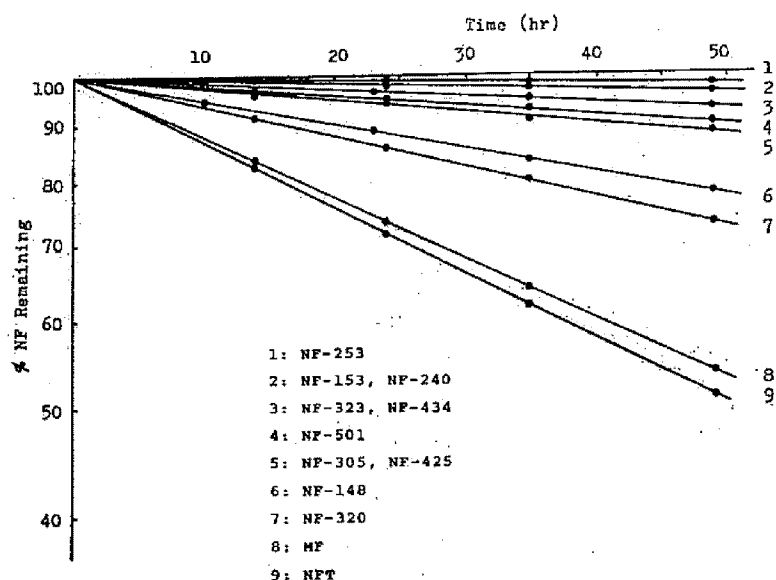
第11表 Structure of Nitrofurans

NF-148		-NO ₂	NFT		-NO ₂
NF-153		-NO ₂	NF		-NO ₂
NF-253		-NO ₂	NF-501		-NO ₂
NF-305		-NO ₂	NF-425		-NO ₂
NF-320		-NO ₂	NF-434		-NO ₂
NF-323		-NO ₂	NF-240		-NO ₂

Ⅲ-1-a 培地中での安定性

菌体共存に関する対照実験として、塩濃度を補正し pH 7.0 に調整したリン酸ブイオンを用いて安定性の検討を行った。第33図は12種の薬物に関する安定性の結果をまとめたものである。いずれも培地中では、見かけ上擬一次反応速度式に従う分解を示した。

第12表に算出された K_{app} と $t_{1/2}$ をまとめた。薬物間での比較から、ビニル結合体の方が概して不安定であるが、ブイオン中では総じて長時間にわたり安定性がかなり保持される。



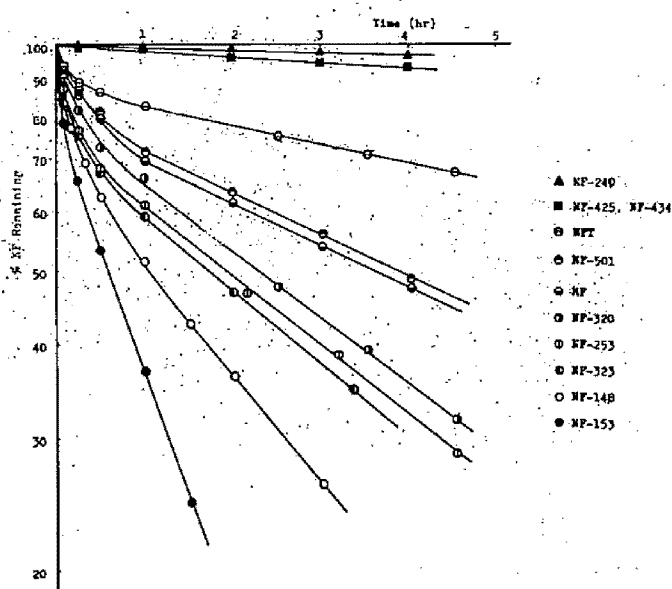
第33图 Stability of Nitrofurans in Phosphate Broth (pH 7.0) at 37°

第12表 Apparent Rate Constants and Half-Lives for the Degradation of Nitrofurans in Phosphate Broth (pH 7.0) at 37°

Nitrofurans	$k_{app}(10^2 \text{ hr}^{-1})$	$t_{1/2}(\text{hr})$
NF-148	0.498	139
NF-153	0.0780	888
NF-253	0.0512	1350
NF-305	0.258	269
NF-320	0.624	111
NF-323	0.144	481
NPT	1.370	50.6
MF	1.220	56.8
NF-501	0.216	321
NF-425	0.260	267
NF-434	0.141	491
NF-240	0.0699	991

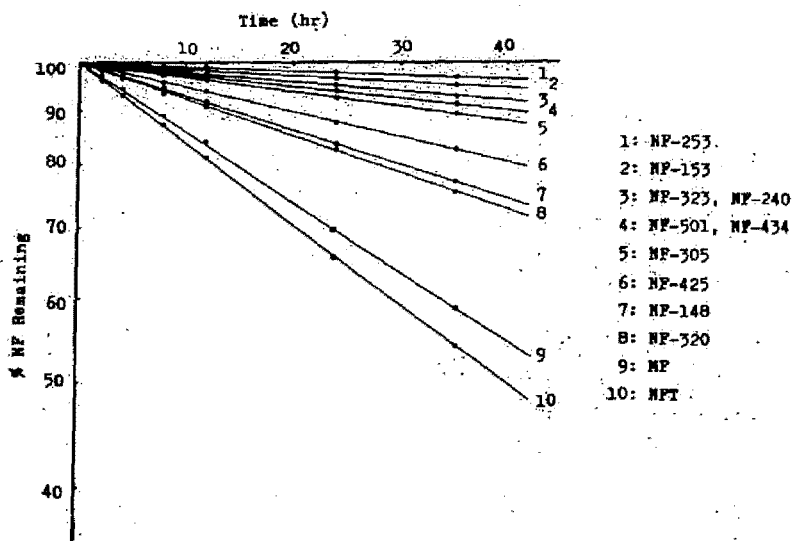
III-1-b 菌体共存下での消失現象

ここでは、感受性株または耐性株を 0.2 mg/ml の濃度で含有する培地中での薬物の消長について検討した。第34図は感受性株に関する結果を示したものである。さきの結果との比較から明らかなように、ビニル結合体、アゾメチン結合体については消長が著しく促進されるが、環直結体、エチレン結合体、ニトロ基不含のものではこの傾向がほとんど見られなかった。しかも前二者の消失における形態として、初期の極めて速い phase と以後の直線的ではあるが遅い phase とが見られ、いわゆる bi-exponential タイプの消失現象が認められた。また薬物間での比較からさきの結果とは逆にビニル結合体の方が概して速い消失を示した。



第34図 Disappearance Profile of Nitrofurans in Phosphate Broth (pH 7.0) Suspended with *St. aureus* (0.2 mg/ml) at 37°

第35図は耐性株に関する結果である。ここでは感受性株の場合と異なり、顕著な消失現象は認められず、第33図の結果と大差がなかった。以上の結果から、消失現象は感受性菌株との相互作用によるものであり、これには薬物の構造特異性が存在するものと考えられる。なお、以後の検討は主として感受性株を使用して行った。

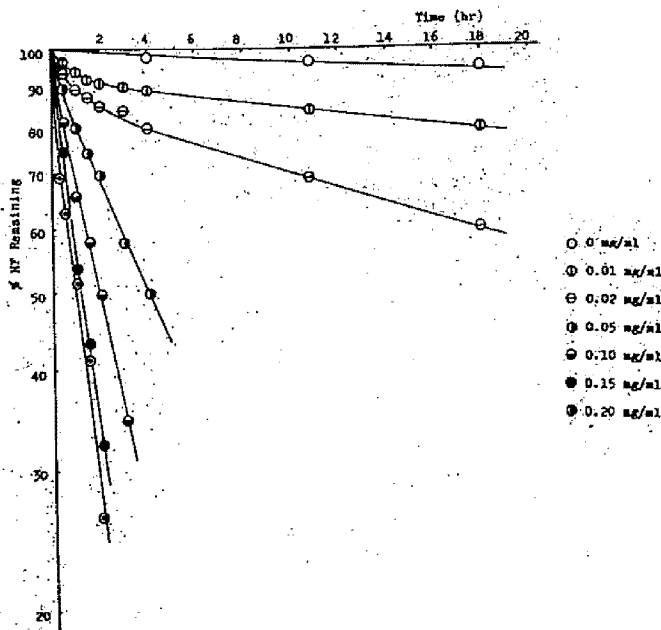


第35図 Disappearance Profile of Nitrofurans in Phosphate Broth (pH 7.0) Suspended with *St. aureus*-resistant (0.2 mg/ml) at 37°

III-1-c 消失におよぼす菌体濃度の影響

ここでは薬物の初濃度を一定とし、分注する菌体を各種の濃度に変化させることにより消失現象をみた。第36図は最も消失速度の速い NF-153 を例として示したものである。

菌体濃度の増加にともない消失速度も大きくなることから、培養条件下での nitrofurantoin 誘導体を消失させる因子は菌体自身に存在することが確認された。他のビニル結合体およびアゾメチン結合体に関しても全く同様の傾向が認められた。



第36図 Effect of Varying Cell Quantity of *St. aureus* Suspended in Phosphate Broth (pH 7.0) on the Disappearance of NF-153 at 37°C

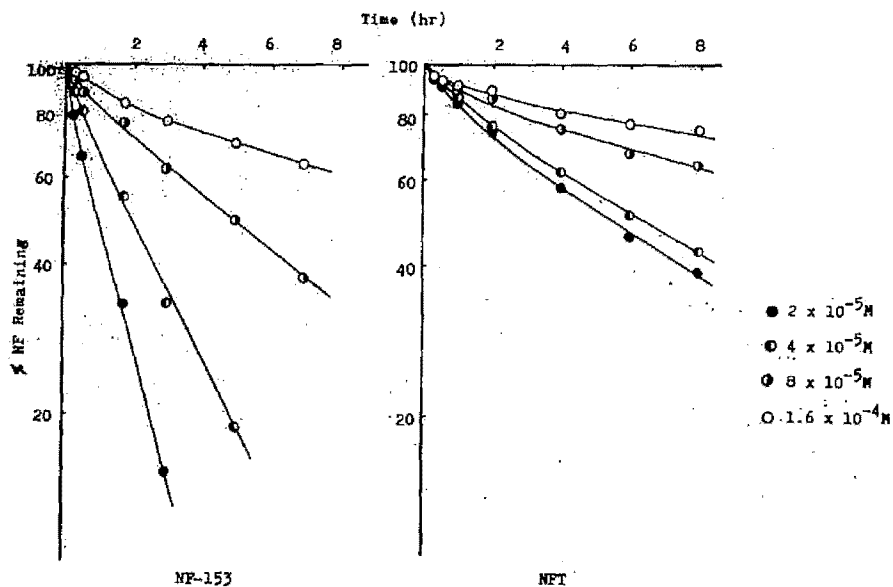
III-1-d 消失におよぼす薬物の初濃度の影響

ここでは菌体濃度を 0.1 mg/ml の一定とし、薬物の初濃度を変化させることにより消失現象をみた。

第37図はNF-153およびNFTに関する結果である。いずれも初濃度の増加にともない消失速度の著しい低下が認められることから、菌体共存下での消失現象に関して酵素的作用による飽和現象が存在するものと考えられる。そこで見かけ上擬一次過程と考えられる直線的部分から消失速度を求め、式(16)で表わされる Lineweaver-Burk の理論式⁸⁴⁾を応用し解析を試みた。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + (S)}{V_{\max} (S)} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{(S)} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \dots\dots\dots (16)$$

ここで、 v 、 V_{\max} はそれぞれ反応速度、最大反応速度であり、 (S) は基質(薬物)の濃度であり、 K_m は Michaelis 定数である。



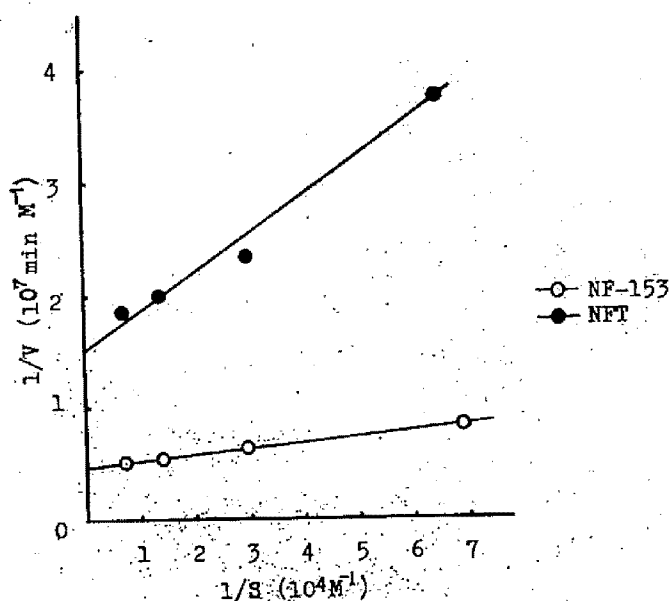
第37図 Effect of Initial Concentration of Nitrofurans on the Disappearance in Phosphate Broth (pH 7.0) Suspended with *St. aureus* (0.1 mg/ml) at 37°

第38図は式(16)における $1/v$ と $1/(S)$ との関係を示したものである。いずれも上記の理論式によく適合し、両者で非競争的な反応様式が認められた。

第11表は V_{max} , K_m 値をまとめたものである。 K_m 値の差から明らかなように、菌体の酵素的作用に対してビニル結合体の方がより大きな親和性を示した。

第11表 Maximal Velocity and Michaelis Constant for Linear Disappearance of Nitrofurans

	NF-153	NFT
$V_{max} (\text{min}^{-1}\text{M})$	2.124×10^{-7}	6.527×10^{-8}
$K_m (\text{M})$	1.164×10^{-6}	2.265×10^{-6}

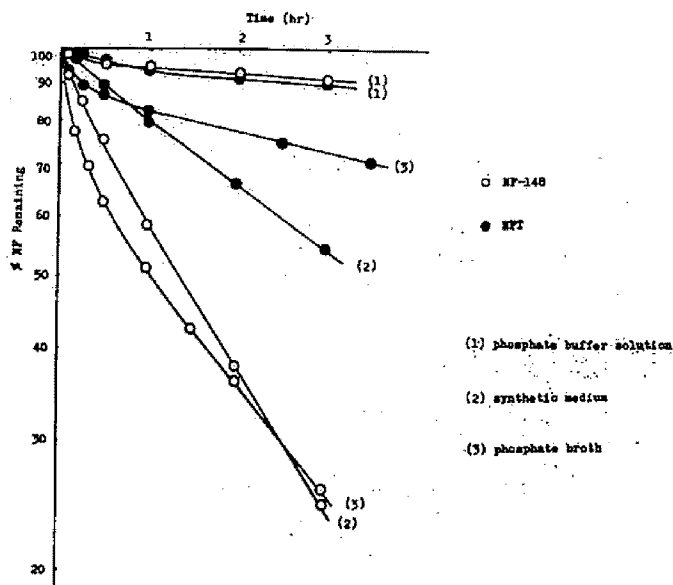


第38図 Lineweaver-Burk Plots for Linear Disappearance of NF in the Presence of *St. aureus*

III-1-e 消失におよぼす培地成分の影響

ここでは菌体濃度を 0.2 mg/ml に一定とし、リン酸ブイオンをはじめとする三種類の培地中での消失現象を比較検討した。第39図はNF-148 および NFT に関する結果を示している。

リン酸緩衝液中では3時間後においても約10%程度の消失しか示さないのに比べ、リン酸ブイオンおよび glucose, arginine を主成分とする合成培地中ではそれぞれ NFT で約45%、25%程度、NF-148 で約75%程度の消失となった。すなわち、菌体共存という培養条件下での消失は菌体の生理的条件を満足させる培地成分により大きく影響を受けることが明らかとなった。

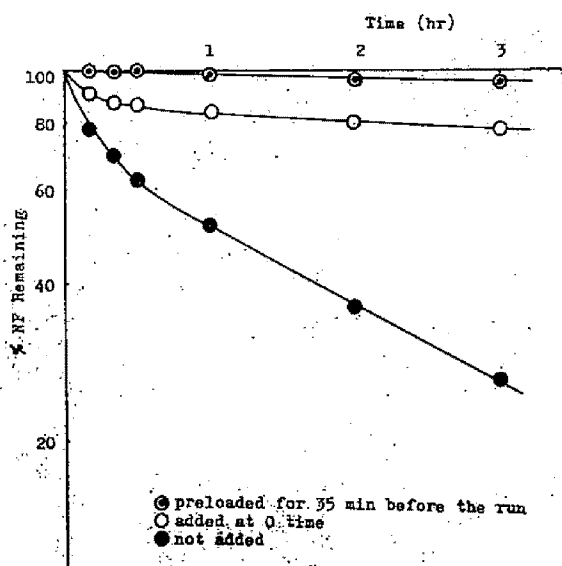


第39図 Effect of Medium Components on the Disappearance of Nitrofurans in pH 7.0 Suspension of *St. aureus* (0.2 mg/ml) at 37°

III-1-f 消失におよぼす *p*-chloromercuribenzoate の影響

種々の条件において、nitrofuran 誘導体の還元分解反応は SH 化合物によりひきおこされることがすでに報告されている。^{80)~83)}そこで、さきに論じた菌体共存下での消失挙動に關与する因子を知る目的で、SH 基阻害剤として *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) を選び、消失におよぼす影響を検討した。第40図はNF-148に關する結果を示したものである。

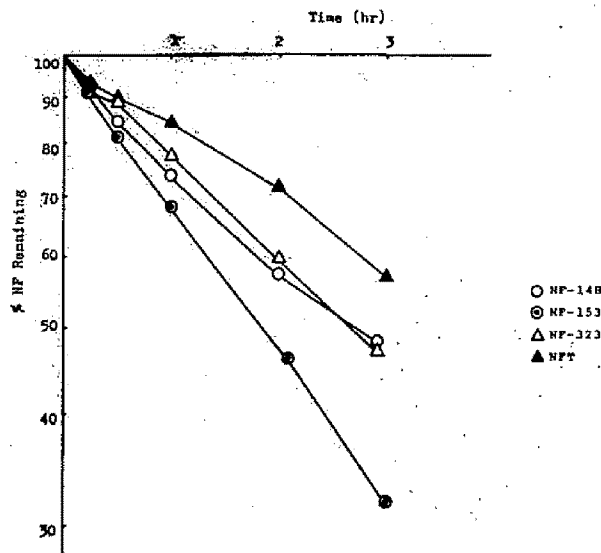
反応開始時に添加した場合、やはり bi-exponential な消失現象となるが、初期の落込みおよび以後の直線的消失のいずれも無添加の対照に比べ著しく抑制された。さらに前処理をほどこすと、消失はほとんど完全に阻害されることが明らかとなった。これらの点から、菌体共存下での消失には SH 基を有する菌体内成分の關与する可能性が強く示唆された。また、これまでの結果から、bi-exponential な消失現象における初期の落込みと直線的消失とはそれぞれ菌細胞壁への取りこみおよび菌体内での酵素触媒的分解に起因するものと推察されたので、以下その検討結果について論ずる。



第40図 Effect of PCMB on the Disappearance of NF-148 in Phosphate Broth Suspended with *St. aureus* (0.2mg/ml) at 37°

Ⅲ-1-g 薬物の菌細胞壁への結合

まず試験菌の超音波処理および遠沈操作により得られた菌細胞壁画分を使用して、nitrofurran 誘導体の消失現象について検討した。第41図は四種の誘導体に関する結果である。菌体濃度を考慮に入れると、さきの第43図に示した結果に比べ消失速度は若干減ずるが、各薬物間での初期の消失傾向において intact cell の場合と良好な相関性が認められた。また、これらの消失傾向は一定時間後にほぼ停止に至ることも確かめられた。この結果から、bi-exponential な消失現象における初期の落込みは菌細胞壁への取りこみによるものであることが強く示唆された。最近、tetracycline に関して *E. coli* や *Staphylococci* への取りこみの機構を報告する例が若干みられ、輸送における飽和現象,⁸⁵⁾ 蓄積における二相性,⁸⁶⁾ 能動的蓄積現象,⁸⁷⁾ などの知見が得られている。しかし、nitrofurran 誘導体に関して検討した例は見当たらない。



第41図 Disappearance Profile of Nitrofurans in Phosphate Broth (pH 7.0) Suspended with Cell Wall Fraction of *St. aureus* (0.8mg/mL) at 37°

そこで、薬物の菌細胞壁への結合におよぼす培地成分およびPCMB添加の影響を平衡透析法の応用により検討した。第12表はNF-148についての結果である。リン酸緩衝液中で結合は極めてわずかであるが、合成培地においてはかなりの結合率を示すとともにこれが必須成分の濃度に依存することが認められた。

一方、ブイヨン中では約50%もの結合率に達することが認められた。またPCMBの添加により、結合はほぼ完全に阻害されることも明らかとなった。第13表は合成培地を使用して各誘導体間での比較をみたものである。ビニル結合体の方がやや高い結合率を示したが、見かけ上両者において有意な差異は得られなかった。これは intact cell の場合とことなり、細胞壁面分では各薬物の飽和結合濃度がほぼ同程度であるためと考えられる。

以上の諸点から、nitrofuran 誘導体の菌細胞壁への取りこみないし結合は能動的であり、かつ菌細胞壁内のSH基を含有する成分に支配されることが明らかとなった。

第12表 Effect of Medium Components on the Binding of NF-148 to Cell Wall Fraction of *St. aureus* at pH 7.0 and 37°

Media	% bound ^{a)}
Phosphate buffer medium	1.88
1/5 Synthetic medium	19.8
Synthetic medium	43.3
Synthetic medium + PCMB ^{b)}	0.785
1/5 Phosphate broth	50.7

a). tested by equilibrium dialysis employing initial concentration of $8 \times 10^{-5} M$

b). concentration of $1 \times 10^{-4} M$

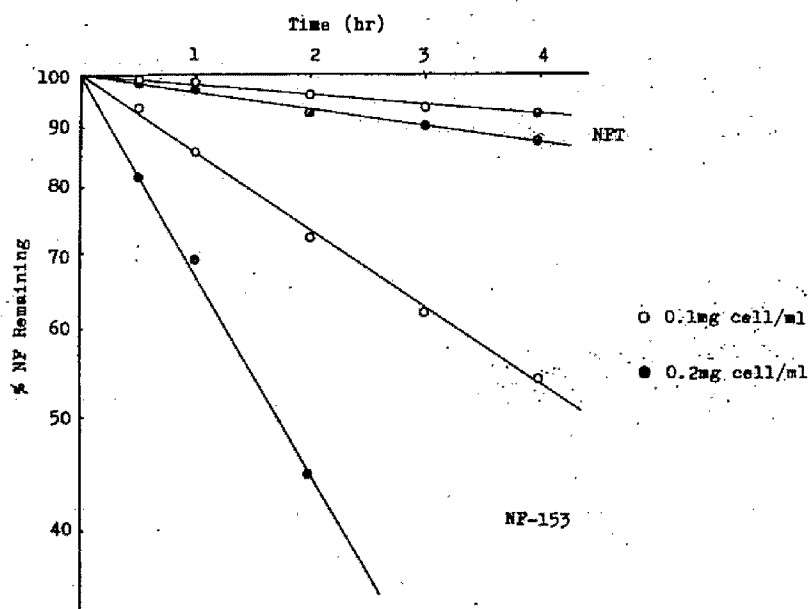
第13表 Comparison of Binding of Nitrofurans to Cell Wall Fraction of *St. aureus* in pH 7.0 Synthetic Medium at 37°

Drug	% bound
NF-148	43.3
NF-153	37.1
NF-323	33.7
NFT	41.8

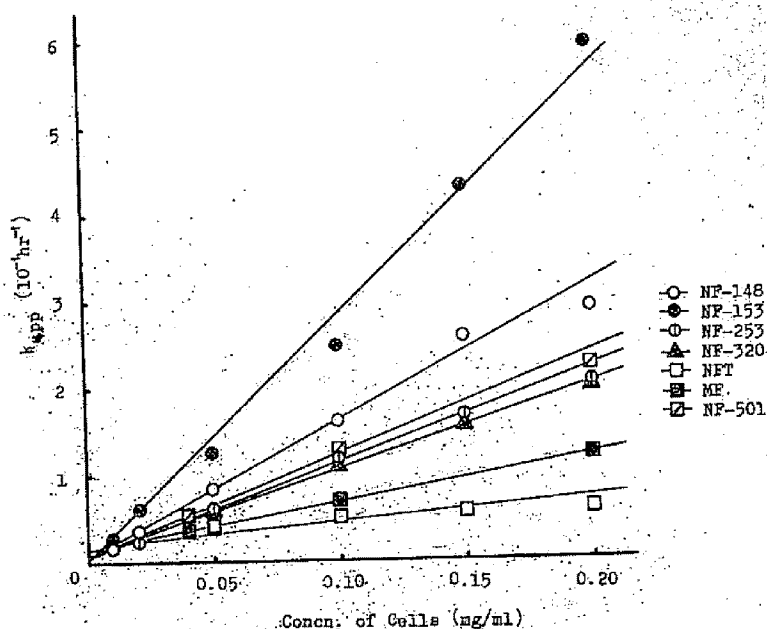
Ⅲ-1-h 薬物と菌細胞内成分との相互作用

まず試験菌の超音波処理および遠沈操作により得られた可溶性ならびに顆粒画分を用いて薬物の

消失現象を検討した。第42図は NF-153およびNFT に関する結果である。ビニル結合体の方が消失は速く、さきの intact cell に比べ両薬物とも消失の低下が見られるが直線的消失傾向はよく一致した。そこでNF-153 について第36図に示したと同様に、各薬物の菌濃度変化による消失現象における直線部分に着目し、解析を試みた。第43図は見かけの消失速度定数を菌濃度に対してプロットしたものである。いずれの薬物も消失速度は菌濃度に比例して増大し、ビニル結合体の方にその傾向が顕著にあらわれた。すなわち、消失現象における直線的減衰は菌細胞内成分による触媒的分解に起因するものであることが強く示唆された。



第42図 Effect of Subcellular Fraction on the Disappearance of Nitrofurans in Phosphate Broth (pH 7.0) at 37°



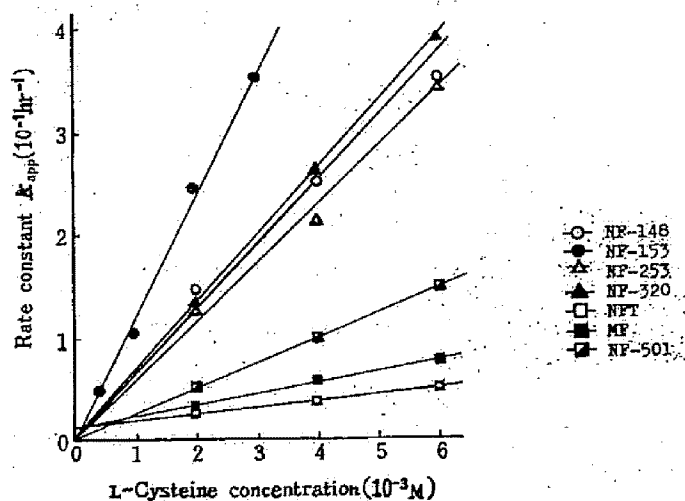
第43図 Effect of Varying Cell Quantity of *St. aureus* on Rate Constants for the Linear Disappearance of Nitrofurans in Phosphate Broth (pH 7.0) at 37°

Ⅲ-1-i 安定性におよぼす L-cysteine の影響

これまでの結果から、菌体共存による薬物の直線的消失現象は細胞内成分による触媒的分解に起因するものであり、また初期に見られる菌細胞壁への取りこみと同様に菌体内の SH 基含有成分との相互作用によるものであることが明らかとなっている。ここではモデル SH 化合物として L-cysteine を選び、nitrofurran 誘導体の安定性におよぼす影響について検討し、さきの結果と比較した。

第44図は7種の薬物の安定性におよぼす L-cysteine の影響をみたものである。ビニル結合体の方がより分解を受けやすく、速度定数は L-cysteine の濃度に比例して増大することが認められた。第1.4表は、さきの第43図の結果を含め式(1)の適用により算出した触媒速度定数をまとめたものである。また第45図は菌体および L-cysteine による触媒速度定数の相関性を

みである。両者による触媒速度定数の間には、 $r=0.914$ なる極めて良好な相関関係が認められた。以上の結果から、nitrofuran 誘導体の *St. aureus* 共存下での bi-exponential な消失現象における直線的減衰は菌細胞内の SH 基含有成分による触媒的分解に起因するものであることが強く示唆された。



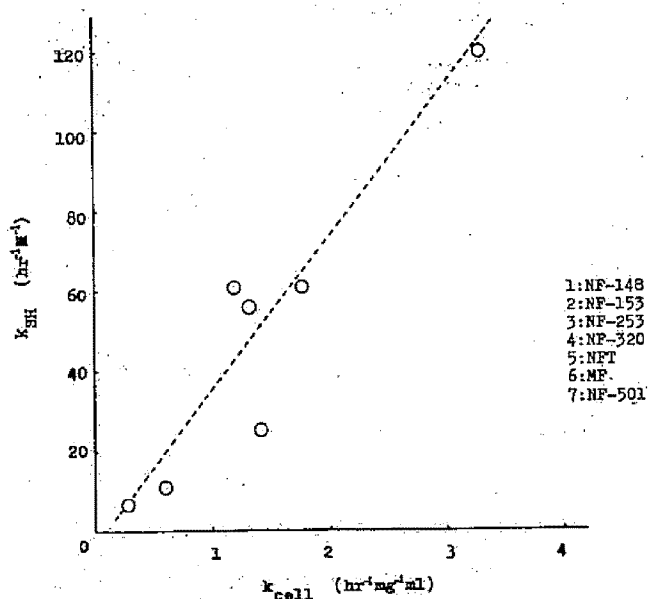
第44図 Effect of L-Cysteine on the Stability of Nitrofurans in Phosphate Broth (pH 7.0) at 37°

第14表 Apparent Catalytic Rate Constants for the Disappearance of Nitrofurans by *St. aureus* and L-Cysteine in Phosphate Broth (pH 7.0) at 37°

No.	Nitrofurans	k_{cell} ($\text{hr}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{ml}$) ^{a)}	k_{SH} ($\text{hr}^{-1}\text{M}^{-1}$) ^{b)}
1	NF-148	1.81	60.4
2	NF-153	3.33	119
3	NF-253	1.32	55.8
4	NF-320	1.21	60.4
5	NFT	0.288	6.18
6	MF	0.600	10.4
7	NF-501	1.42	24.2

a) apparent catalytic rate constant for the disappearance by the bacterial cells

b) apparent catalytic rate constant for the degradation by L-cysteine



第45图 Correlation of Apparent Catalytic Rate Constants of k_{cell} and k_{SH}

III-1-j 考 察

数種の nitrofuran 誘導体を用い菌体共存という培養条件における消失挙動に関して詳細な検討を行った。菌体を共存させない対照実験では、リン酸ブイヨン中での分解が擬一次反応速度式に従い、いずれもかなり安定であることが認められた。一方、菌体共存という培養条件では、感受性菌に関してビニル結合体およびアゾメチン結合体の極めて速い bi-exponential な消失が認められ、その速さは概して前者でより著しいことが明らかとなった。これらの消失速度は菌濃度と共に増大し、薬物の初濃度変化により菌体の酵素反応機作の存在を示し、かつ培地成分により著しい影響を受けた。しかし、環直結体、エチレン結合体、ニトロ基不含のものでは顕著な消失現象が全く見られず、また耐性菌共存下ではどの薬物も上記の様な消失現象がほとんど認められなかった。

ついで、消失現象における初期の落込みと直線的減衰とに関して詳細な解析と検討を加えた結果、前者は菌細胞壁面分への取りこみ、後者は主として細胞内成分による触媒的分解に起因するものであり、いずれも PCMB により著しく抑制されることなどから、菌体内の SH 基含有成分との相互作用の存在が明らかとなった。これらの結果は、nitrofuran 誘導体の抗菌活性や抗菌作用機序を適切に評価するうえで重要な手がかりを与えるものであると考えられる。

III-2 Nitrofuran 誘導体の *in vitro* 抗菌活性

nitrofuran 誘導体の *in vivo* ないし *in vitro* における抗菌活性に関しては多くの報告が見られるが、^{75), 80)~82), 88)~96)} 薬物の菌体共存下での挙動と抗菌活性との関連を論じたものは数少ない現状である。鈴木⁸⁸⁾、McGalla⁹⁵⁾ は薬物のニトロ基還元反応がそれぞれ *Staphylococci* や *E. coli* に対する抗菌活性と一定の関連性を有することを示唆している。また Waterbury⁹⁷⁾ は *Staphylococci* に対する抗菌作用機序として、細胞壁合成阻害の可能性を報告している。

ここでは、さきの菌体共存時における消失挙動のうち特に各薬物間での速度の差異に着目し、これと *in vitro* 抗菌活性との関連性を知る目的で *St. aureus* に対する MIC の検定を行った。

III-2-a 感受性菌に対する最少発育阻止濃度の検定

第15表は十種の薬物に関してリン酸ブイヨン中での MIC 値をまとめたものである。これから明らかなように、アゾメチン結合体に比べビニル結合体の方が相対的に抗菌活性がすぐれており、一方、これらに属さない他の三種についてはほとんど活性が認められなかった。すなわち、さきに示

した菌体共存下での消失速度と *in vitro* 抗菌活性との間に有意な相関性の存在することが明らかとなった。なお、リン酸緩衝液や合成培地を用いての検討も試みたが、これらは試験菌の発育に滴しておらず前述のリン酸ブイオン中での結果との比較は困難であった。

第15表 Comparison of Minimal Inhibitory Concentrations of Nitrofurans against *St. aureus*-sensitive

Nitrofurans	MIC (M)
NF-148	4×10^{-6}
NF-153	4×10^{-6}
NF-320	1.6×10^{-5}
NF-323	1.6×10^{-5}
NFT	4×10^{-5}
MF	4×10^{-5}
NF-501	2×10^{-5}
NE-425	$> 5 \times 10^{-4}$
NF-434	$> 2 \times 10^{-4}$
NF-240	$> 1 \times 10^{-3}$

III-2-b 耐性菌に対する最少発育阻止濃度の検定

第16表はさきと同様に五種の薬物に関してリン酸ブイオン中での MIC 値をまとめたものである。ビニル結合体のうち NF-153 のみに抗菌活性が認められたが、感受性菌の場合のわずか $\frac{1}{25}$ 程度であり、他の薬物では溶解度以下の濃度範囲において全く活性を示さなかった。この結果もさきに述べた耐性菌共存下での消失挙動とよく類似する傾向である。

Figure Comparison of Minimal Inhibitory Concentration of Nitrofurans against *St. aureus*-resistant

Nitrofurans	MIC (M)
NF-153	1×10^{-4}
NF-320	$> 4 \times 10^{-4}$
NFT	$> 2 \times 10^{-4}$
NF-501	$> 5 \times 10^{-4}$
NF-425	$> 5 \times 10^{-4}$

III-2-c 考 察

さきに論じた菌体共存下での薬物の消失挙動と *in vitro* 抗菌活性との関連を知る目的で、種々の nitro-furan 誘導体に関し MIC 検定法により *St. aureus* に対する抗菌力を検討した。

感受性菌に対してはビニル結合体が最もすぐれた活性を示し、アゾメチン結合体がこれに続いたが、環直結体など三種のものではほとんど活性を示さなかった。一方、耐性菌に対しては、いずれも無視しうる程度の活性しか示さなかった。これらの結果は菌体共存下での消失挙動によく類似する傾向を示し、培養条件下での消失挙動がそのまま *in vitro* 抗菌活性に反映されることが明らかとなった。さらに、薬物の菌細胞壁への取りこみおよび細胞内成分との相互作用における SH 基含有成分の役割は抗菌作用機序の重要な一面をなすものであると示唆された。

III-3 ま と め

培養試験中の薬物の力価が主として培地成分のみにより変動を受けるという前章までの結果に加えて、本章では、試験菌の共存による培養液からの著しい消失現象と *in vitro* 抗菌活性との関連を主要な検討課題とし、薬物および試験菌としてそれぞれ nitro-furan 誘導体、*St. aureus* の感受性菌ならびに耐性菌を選び、培地成分の特異な効果について種々の検討を行った。その結果、感受性菌の場合のみ、薬物の培地中からの消失が顕著に認められ、これには構造特異性の存在することが明らかとなった。培地中からの消失機構は主として菌細胞壁への取りこみおよび細胞内成分

との相互作用によるものであり、ここで菌体内の SH 基含有成分の支配的役割が示唆された。

さらに特筆すべき事実は、感受性菌の共存によるこれらの消失挙動がいずれも培地成分により独特の影響を受けることであり、とりわけ試験薬物の菌体への取りこみは菌体の正常な発育や機能に必須と考えられる培地成分により著しく促進されることが判明した。この点は、前章までに論じた力価変動の問題とは若干意味を異にするが、抗菌性薬物の有効性という観点から考えて、*in vitro* 抗菌力試験における培地成分のこのような役割の重要性を示すものである。このことは *in vitro* 抗菌力試験の結果から明らかなように菌体の取りこみによる培地中からの消失挙動が抗菌活性にそのまゝ反映されるという事実からも強く示唆された。

本章での結果は、前章までの結果と同様、*in vitro* 抗菌力試験における抗菌活性を正しく評価するうえで新たな指針を与えるとともに、培地成分の役割の重要性や適切な培地成分の選択などに対して有用な示唆を与えるものである。

以上、著者は三系列の抗菌性薬物の培地中ならびに培養条件下での安定性および消失挙動に関して系統的検討を行い、これらの機構およびこれらと *in vitro* 抗菌力試験の結果との関連性を明らかにするとともにいずれの場合も培地成分が極めて重要な役割を演ずることを明らかにしたが、これらを要約すると次のとおりである。

1 Isoniazid 誘導体の安定性におよぼす培地成分の影響と *in vitro* 抗菌活性

培養が比較的長期にわたる例として、モデル薬物に *furylmethylketone isonicotinoylhydrazone* (FKI), *glucose isonicotinoylhydrazone* (GI) および *sodium pyruvate isonicotinoylhydrazone* (NaPI) の三種の *isoniazid* (INAH) *hydrazone* 類を選び、結核菌培養培地として繁用される七種の培地を用い、安定性およびこれに影響をおよぼす因子について検討するとともに *in vitro* 抗菌活性との関連についても考察した。

培地中での分解は、いずれも INAH を生成し、擬一次反応速度式に従う加水分解反応であることが認められた。培地中での分解速度は最も安定性にすぐれる中性附近の水溶液中に比し、FKI, GI, NaPI でそれぞれ $\times 10 \sim 30$ 倍、 $4 \sim 15$ 倍、 2.7 倍前後にも達することが明らかとなった。そこで培地成分の影響とその機構に関して検討を加えた結果、加水分解促進効果は菌体発育に必要な N 源であるアミノ酸や蛋白質の遊離のアミノ基が一般塩基触媒として作用することに起因するものと判明した。

ついで、試験菌として *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) を使用し、*in vitro* 抗菌活性に関して種々の検討を行った。最少発育阻止濃度の結果から、FKI および極めて分解の速い NaPI の抗菌力は INAH と全く同等となるが、GI のそれは INAH より小さく加水分解による INAH 生成の速い培地中においてよりすぐれていることが認められた。さらに薬物-菌接触時間の影響を調べた結果、いずれの薬物も約 8 時間前後という培養の初期においてその抗菌活性をほぼ発揮しつくすことが明らかとなった。

以上の諸点から、脂溶性が極めて低いためそのまゝでは不活性と考えられる GI および NaPI の抗菌活性は加水分解に起因する INAH 生成速度に依存するものと考えられ、この種の薬物では培養の極めて初期における安定性の差異が抗菌力試験の結果に直接反映されることが示唆された。

さらにこれらの安定性すなわち培地中での活性薬物の有効濃度が主としてアミノ酸などの培地成分により決定的な影響を受けることも明らかとなった。一般に抗結核化学療法剤などのように長期の培養試験が必要とされる場合、本章で明らかにしたように、培地成分が培養初期における被検薬物の力価を著しく変動させそれが試験結果にそのまま反映されるという事実は、従来の *in vitro* 抗菌力試験による活性の評価に対して新たな指針を与えるものである。

Ⅱ Penicillin 誘導体の安定性と *in vitro* 抗菌活性におよぼす銅イオンの影響

in vitro 培養試験において菌体が特定の微量金属イオンを必要とする場合が考えられるので、本章ではモデル薬物として benzylpenicillin (BP) および 2,6-dimethoxyphenylpenicillin (DMP) を選び、培地にはグラム陽性・陰性菌培養培地として繁用されるリン酸ブイヨンを用いて、安定性と *in vitro* 抗菌活性におよぼす培地成分としての銅イオンの影響について検討を行った。

従来の知見と異なり、分解は中性分解産物である penicillenic acid 同族体のみを生成し擬一次反応速度式に従う加水分解反応であり、銅イオンにより著しく促進されることが明らかとなった。さらに分解促進効果について検討を加えた結果、銅イオンの低濃度、高濃度領域でそれぞれ加水分解反応に対する触媒効果および複合体形成効果が支配的因子となることが示唆された。

また、本来の培地成分である蛋白質やアミノ酸などがこれらの効果のある程度抑制することも明らかとなった。

一方、*in vitro* 抗菌活性に関しては、*Staphylococcus aureus* FAD 209P-sensitive を用いて前章と同様に検討した結果、銅イオン添加による安定性の差異と最少発育阻止濃度の値との相関性は見かけ上低濃度領域においてのみ有意であった。また前章の結果と同様、penicillin 誘導体に関しても培養初期にその抗菌活性の大半が発揮されることが認められ、さらに銅イオンの添加による脂溶性の上昇から薬物の菌細胞壁への透過性の増大が予測された。

以上の諸点から、銅イオンを含有する培地中での BP および DMP の安定性の差異は同時に期待される菌細胞壁への透過性増大の程度と見かけ上バランスを保ちつつ *in vitro* 抗菌力試験結果に反映されるものと考えられる。

ここでは、penicillin 誘導体と培地中の銅イオンとの相互作用を中心に検討したが、一般に生物学的に必須かつ重要な金属イオンが必要とされる培養条件において、前章でのアミノ酸や蛋白質などの役割と同様に微量金属イオンが薬物と複雑な相互作用をすることによりその力価を本質

的に変動させる主要因ともなり得ることが明らかとなった。

Ⅲ Nitrofuran 誘導体の菌体共存下での消失挙動と *in vitro* 抗菌活性

(I), (II)とは異なり培地成分のみでは安定であるにもかかわらず菌体共存時には培養液からの著しい消失が予想される場合として、nitrofuran 誘導体を取りあげ検討を行った。薬物にはビニル結合体六種、アゾメチン結合体三種、さらに比較として環直結体、エチレン結合体、ニトロ基不含のもの各一種を選び、培地には主としてリン酸ブイヨンを使用し、*St. aureus* 共存下での薬物の培地中からの消失挙動と *in vitro* 抗菌活性との関連について種々の検討を試みた。

感受性菌共存時、ビニル結合体およびアゾメチン結合体は bi-exponential な様相を有する著しく速い消失現象を示した。消失速度は菌濃度に比例して増大し、概してビニル結合体の方が大きいことが明らかとなった。菌体共存時の消失現象が培地成分により著しい影響を受けることが判明し、かつ菌体による酵素反応的機作の関与が予測されたのでこれらの要因に関して精査を加えた結果、菌細胞壁への取りこみと細胞内成分による触媒の分解とが重要な役割を演じており、菌体内の S H 基含有成分が不可欠なものであることが示唆された。また、試験薬物の菌細胞壁への取りこみが菌体の発育や機能に必須とされる培地成分によって著しく促進されるという興味ある現象も認められた。比較として用いた三種の薬物では上記のような消失現象が全く認められないことから消失における構造特異性が存在するものと考えられる。一方、耐性菌においては、いずれの薬物も感受性菌で見られたような顕著な消失現象は全く認められなかった。

次いで最少発育阻止濃度の検定により *in vitro* 抗菌活性を比較検討した結果、感受性菌に対してはビニル結合体の抗菌活性が最大となり、耐性菌に対してはどの薬物もほとんど活性が認められず、菌体の共存および培地成分により支配される薬物の培地中からの消失挙動と *in vitro* 抗菌活性との間に有意な相関性のあることが明らかとなった。

以上、著者は三系列の抗菌性薬物をモデルとし培地中ならびに培養条件下での安定性および消失挙動に関して系統的検討を行い、これらの機構を明らかにするとともにいずれの系列においても培地成分が極めて重要かつ特色ある役割を演ずることを明らかにすることができた。これらの諸点は *in vitro* 抗菌力試験、とくに化合物間の相対的抗菌活性の比較試験等を行うに際して、無視しえない影響をおよぼすものである。

試験培地中における薬物が本来安定であるか否かにより抗菌力試験の結果がそれぞれ絶対的または相対的なものとなり得る点から考えて、本研究の成果はひろく他の抗菌性薬物の評価ならびに検

定法に対して新たな指針となり得るのみならず、抗菌薬剤療法における投与計画の設定に対しても寄与するものと考ええる。

謝

辞

終りに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭達を賜わった恩師
京都大学故掛見喜一郎名誉教授ならびに京都大学瀬崎 仁教授に深甚なる謝意
を表します。

また有益な御助言と御指導を賜わった京都大学村西昌三助教授並びに京都大
学薬学部薬剤学教室出身者、教室員各位および名古屋市立大学薬学部薬剤学教
室関係者各位に深謝します。さらに実験の一部に御協力をいただいた佐野征人
学士、小林宏志修士、乾 賢一修士並びに小田晃一郎修士に深く感謝します。

実験の部

第I章 実験の部

(D)-(1) Isoniazid 誘導体の安定性におよぼす培地成分の影響

(i) 水溶液中での安定性

isoniazid (INAH) は市販純末, furylmethylketone isonicotinoylhydrazone (FKI) および sodium pyruvate isonicotinoylhydrazone (NaPI) はそれぞれ第一製薬株式会社, 田辺製薬株式会社より分与されたもの, さらに glucose isonicotinoylhydrazone (GI) は Zinner らの方法⁹⁸⁾ に従い合成したものを用いた。使用した緩衝溶液の組成を第1表に示す。

第1表 Buffer Compositions

pH 2.0	HCl
pH 3.0-5.0	$\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$
pH 6.0-8.0	$\text{KH}_2\text{PO}_4-\text{K}_2\text{HPO}_4$
pH 9.0-10.0	$\text{H}_3\text{BO}_3-\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

イオン強度 ($\mu = 0.1$) の調整は KCl により行った。各薬物を $1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で適当な初濃度となるように緩衝溶液に溶解させたものを試料溶液とし, 37°C 恒温槽中にて反応を行った。試料を経時的に採取し, 後述の定量法に供するとともに, 薄層クロマトグラフィー (TLC) の検体としても使用した。

(a) TLC による分解産物の同定法

検体には主として pH 6.0~8.0 における反応試料を用い, 標品はすべて pH 7.0 の緩衝溶液に溶解させたものを使用した。isonicotinic acid (INA) は市販純末を標品とした。条件は総論の部第1図に附記したとおりで, Diller らの方法⁹⁹⁾ に若干の改変を加えたものである。

(b) 薬物の定量法

イ) FKI

試料溶液 1 ml に 0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 6.0) を適量加え反応を停止させ、これに chloroform 5 ml を加えた。5 分間振とう抽出後、遠心分離により得た chloroform 層の 310 mμ における吸光度を測定し、常法により検量線から濃度を求めた。

ロ) GI と NaPI

試料溶液 5 ml に Menzel 緩衝溶液 (0.2 M NaHCO_3 - Na_2CO_3 , pH 9.0) を 1 ml 加えた後、0.1% sodium β -naphthoquinone-4-sulfonate 試液を 0.5 ml 添加し呈色させ、480 mμ における吸光度を測定した。¹⁰⁰⁾ 検量線は INAH 標準溶液を用いて作成した。

(c) 分解速度定数および半減期の計算

分解が擬一次反応速度式に従うことから、見かけの速度定数 (k_{app}) を算出し、半減期 ($t_{1/2}$) とともに第 2 表に示す。

第 2 表 Apparent Degradation Rate Constants and Half-Lives of INAH Derivatives in Buffer Solutions at 37°

pH	FKI		GI		NaPI	
	$k_{app} (\text{min}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{min})$	$k_{app} (\text{min}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{min})$	$k_{app} (\text{min}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{min})$
2.0	3.46×10^{-1}	2				
3.0	4.28×10^{-2}	16	7.65×10^{-3}	91		
4.0	1.01×10^{-2}	69	2.18×10^{-3}	318		
5.0	1.26×10^{-3}	550	4.74×10^{-4}	1460		
6.0	1.38×10^{-4}	5020	5.63×10^{-5}	12300	3.86×10^{-4}	1800
7.0	2.81×10^{-5}	24600	2.97×10^{-5}	23300	9.73×10^{-5}	7120
8.0	3.69×10^{-5}	18700	8.19×10^{-5}	8460	5.32×10^{-4}	1300
9.0	2.17×10^{-4}	3200	2.24×10^{-4}	3090		
10.0	6.17×10^{-4}	1120	7.95×10^{-4}	872		

(d) 薬物の初濃度変化の影響

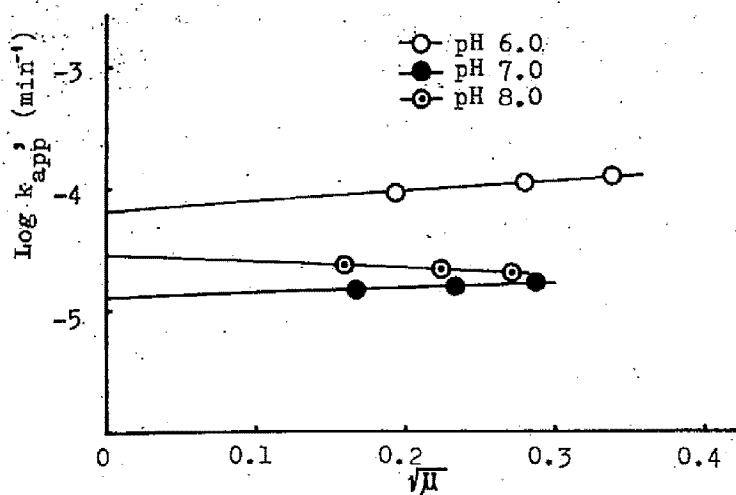
FKIに関する結果を第3表に示す。すなわち初濃度依存性は存在しない。

第3表 Effect of Initial Concentrations of FKI on Apparent Degradation Rate Constants at 37°

Ini. Concn. ($\mu\text{g/ml}$)	k_{app} of FKI at pH 7.0 (10^{-5}min^{-1})
1	3.01
10	2.81
100	2.99

(e) イオン強度の影響

FKIについてpH 6.0~8.0の範囲で検討した結果を第1図に示す。顕著な効果は認められず、 $\mu=0$ での外挿値を総論の部第3図に附記した。



k_{app} : apparent rate constant obtained by extrapolation to zero buffer concentration

第1図 Effect of Ionic Strength on the Stability of FKI at 37°

(四) 培地中での安定性

使用した培地の組成および pH 値は第4表に示すとおりである。GI および NaPI に関する実験には、それぞれ pH 7.0、6.0 に調整した Kirchner 培地および Long 培地を使用した。各薬物を 20~200 μ g/ml の濃度となるよう各培地に分注または溶解させた培養試験管を 37℃ 恒温槽中にて反応させた。

第4表 Compositions of Culture Media

Media Component	Kirchner	Santon	Long	Glycerol-broth	Glycerol-agar	Ogawa
KH ₂ PO ₄	4 g					1 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3 g					
Na-Citrate	2.5 g					
Asparagine	5 g	4 g	5 g			
Na-Glutamate	(or 10 g)		(or 10 g)			1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.6 g	0.5 g	1 g			
Glycerin	20 ml	60 g	50 ml	50 g	50 g	6 ml
(Serum) ^{a)}	(100 ml)					
Distd. water	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml	100 ml
Ferric amm. citr.		0.05 g	0.05 g			
Amm. citr., dibasic			5 g			
K ₂ HPO ₄		0.5 g	3 g			
Citric Acid		2 g				
NH ₄ OH		qs pH 7.4				
Egg solution						200 ml
Peptone				10 g	10 g	
Beef extract				10 g	10 g	
Agar					20 g	
NaCl				2 g	2 g	
2% malachite green						6 ml
pH ^{b)}	6.35	7.35	5.10	7.10	7.10	6.60

a) additional component of 10% serum Kirchner-medium

b) pH measured before solidification

(a) TCLによる分解産物の同定法

液体培地では反応試料そのままを、固体培地では定量操作途中に得られる遠心上清液を検体とした。

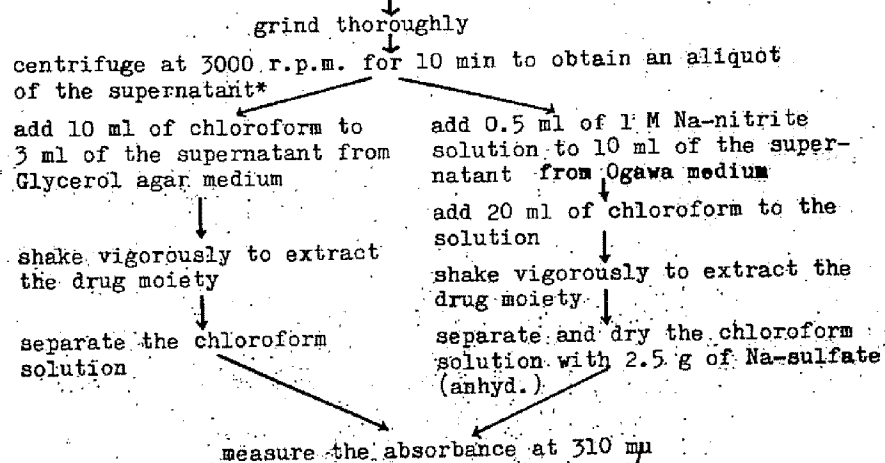
(b) 薬物の定量法

イ) PKI

液体培地の試料 1~2 ml に chloroform 10 ml を加え、さきの (i)~(b) と同様に行った。固体培地の場合は第5表に示す方法で定量した。

第5表 Assay Procedure of FK1 in Solid Culture Media

transfer whole media containing the drug solution into a mortar with the aid of a small amount of pH 6.0 phosphate buffer solution(0.1 M)



ロ) GIとNaPI

さきの(1)-(b)とほぼ同様である。ただし、発色試薬添加後、正確に1分後吸光度測定を行った。

(III) 培地中での安定性に影響をおよぼす因子

N源として asparagine ないし Na-glutamate を含む Kirchner培地中の各培地成分を交互に除去したものを試験培地として使用した。反応および定量操作はさきに述べた方法に従った。Na-glutamateに関する結果を第6表に要約する。

第6表 Apparent Degradation Rate Constants and Half-Lives of FKI in Kirchner Medium at 37°

Excluded Component	$k_{app}(10^4 \text{min}^{-1})$	$t_{1/2}(\text{day})$	pH
None(Control)	3.21	1.50	6.31
KH_2PO_4	3.38	1.42	7.07
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3.38	1.42	6.05
Na-Citrate	3.01	1.60	6.25
Na-Glutamate	0.642	7.50	6.35
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.01	1.60	6.35
glycerin	3.01	1.60	6.35

(V) 安定性におよぼすアミノ酸の影響

0.05M リン酸緩衝溶液 (pH 6.0) に FKI および glycine をそれぞれ $5 \times 10^{-4} \text{M}$, $5 \times 10^{-3} \text{M}$ の濃度で溶解させた試料溶液を 37℃ 恒温槽中にて反応させた。経時的に採取した試料溶液を後述する分離定量法および TLC 法の検体とした。

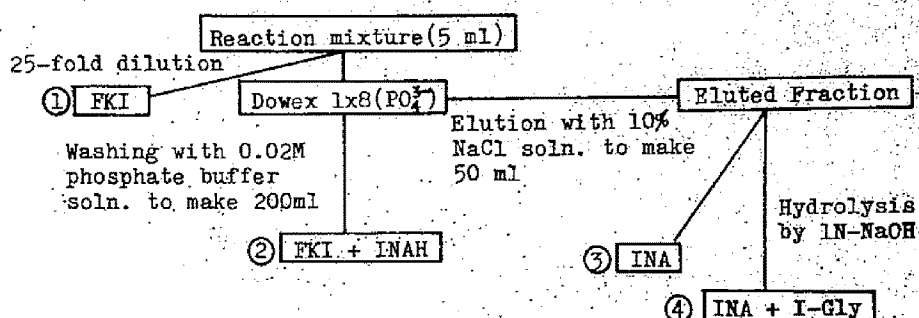
(a) INAH 関連化合物の分離定量法

イオン交換樹脂 Dowex-1×8 を用いる掛見らの方法¹⁰¹⁾ に若干の改変を加えて分離定量法を確立した。要約したものを第7表に示す。

ここで、①は chloroform 抽出操作後 310mμ にて、②、③、④はブロムシアン法¹⁰¹⁾により呈色させた後 425mμ にて吸光度を測定した。FKI, INAH, INA, glycine 抱合体 (I-Gly) の濃度はそれぞれ①、②-①、③、④-③から定量することができる。

第8表に示すように、各成分の回収率は十分に満足しうるものであった。

第7表 Separative Assay Method of INAH and Its Derivatives



第8表 Recovery Percentage of INAH and Its Derivatives

Compound	% Recovery
FKI	99.1
INAH	98.7
INA	99.3
I-Gly	98.6

(b) 各成分の経時的推移

さきの分離定量法により検討した結果をFKIの初濃度を基準とする百分率で表わし第9表に示す。

(c) TLCによる検索

検体は主として反応の最終時の試料溶液を使用し、条件は総論の部第12図に附記したとおりで、(I)および(II)項の場合とほぼ同様であるが展開溶媒に改変を加えた。なお、I-Glyは市販純末を標品とした。

第9表 Remaining and Formed Percentage of INAH
and Its Derivatives

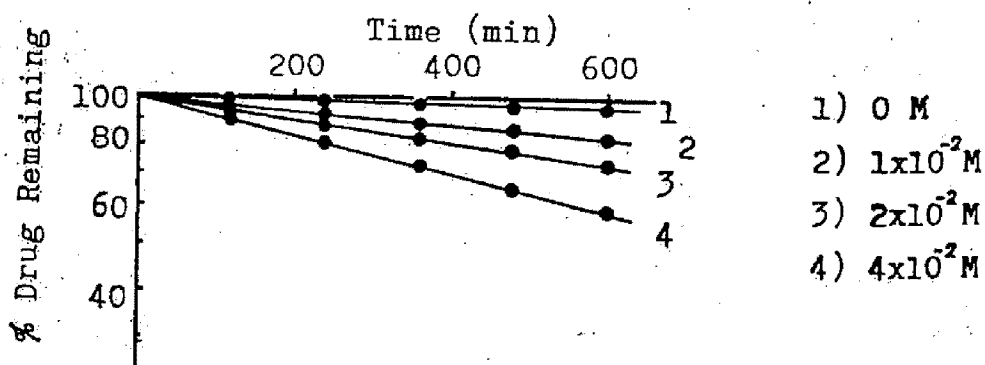
Time (hr)	Per Centage			
	FKI	INAH	INA	I-Gly
0	100.0	0	0	0
8	75.7	21.5	0	0.1
17	46.1	51.3	0.2	0
42	17.2	80.6	0.1	0
220	5.0	91.5	0	0.1

(V) 安定性におよぼす触媒効果

ここでは、総論の部に示すように三点にわたり検討を行ったが、FKIの初濃度はすべて 1×10^{-4} Mとした。

(a) アミノ酸による触媒効果

擬一次反応速度式に従う例を glycine について第2図に示す。見かけの速度定数を第10表に示す。



第2図 Stability of FKI in the Presence of Glycine
at pH 7.0 and 37°

第10表 Apparent Degradation Rate Constants of FKI
in the Presence of Amino Acids at 37°

Concn. (10 ² M)	k_{app} (10 ⁴ min ⁻¹) at pH											
	Glycine				Asparagine				Na-Glutamate			
	5.0	6.0	7.0	8.0	5.0	6.0	7.0	8.0	5.0	6.0	7.0	8.0
0	9.41	1.32	0.323	0.450	9.41	1.32	0.323	0.450	9.41	1.32	0.323	0.450
1	10.3	2.14	2.99	5.53	10.0	2.03	1.68	3.07	9.77	1.71	1.32	2.01
2	11.3	3.08	4.80	10.4	11.0	2.93	3.08	5.14	10.2	2.15	2.18	2.80
3	12.4	4.25	7.23	14.9	12.3	3.75	5.11	7.48	10.7	2.60	2.81	3.49
4	13.1	5.02	9.02	20.9	12.6	4.54	5.98	9.68	11.0	2.93	3.30	4.51

(b) 触媒効果を有する感応基

pH 7.0における三種の glycine 誘導体の影響と、pH 5.0~8.0における methylamine の影響を検討した。見かけの分解速度定数を第11表および第12表に示す。

第11表 Apparent Degradation Rate Constants of FKI
in the Presence of Glycine Derivatives at
pH 7.0 and 37°

Concn. (10 ² M)	k_{app} (10 ⁴ min ⁻¹)		
	N-Methyl	Ethyl ester	Glycyl
0	0.318	0.318	0.318
1	0.316	2.95	9.60
2	0.321	4.91	18.4
3	0.317	7.30	27.1
4	0.320	9.03	36.2

第12表 Apparent Degradation Rate Constants of FKI
in the Presence of Methylamine at 37°

Concn. (10 ⁻² M)	k _{app} (10 ⁻⁴ min ⁻¹) at pH			
	5.0	6.0	7.0	8.0
0	9.32	1.32	0.320	0.450
1	9.40	1.55	1.10	4.13
2	9.45	1.70	1.79	7.10
3	9.50	1.91	2.60	9.97
4	9.57	2.07	3.58	12.9
5	9.60	2.25	4.31	15.9

(c) アミン化合物による一般塩基触媒効果

分解速度定数を第13表に、Brønsted理論式の pK_a 値などを第14表に示す。

第13表 Apparent Degradation Rate Constants of FKI
in the Presence of Amine Compounds at pH 7.0
and 37°

Concn. (10 ⁻² M)	k _{app} (10 ⁻⁴ min ⁻¹)										
	β-Ala	L-Ala	Tau	Ser	Asp-H	Glu-NH ₂	Arg	Lys	His	Try	EA
0	0.320	0.320	0.320	0.320	0.320	0.320	0.320	0.320	0.320	0.320	0.320
1	2.45	0.87	1.01	1.28	1.09	1.70	1.24	1.45	2.61	1.63	1.17
2	4.46	1.19	1.48	2.20	1.68	2.82	2.10	2.62	4.74	2.78	2.02
3	6.25	1.52	2.08	3.11	2.31	3.02	3.07	3.81	6.91	3.93	2.90
4	8.05	2.13	2.53	4.05	2.60	4.31	4.01	5.04	9.15	5.21	3.74

Ala=Alanine, Tau=Taurine, Ser=Serine, Asp-H=Aspartic acid, Glu-NH₂=Glutamine,
Arg=Arginine, Lys=Lysine, His=Histidine, Try=Tryptophan, EA=Ethanolamine

第14表 Value of pKa and Number of p and q for Amine Compounds

Compound	pKa	p	q
Glycine	9.78	1	1
β -Alanine	10.19	1	1
L-Alanine	9.97	1	1
Taurine	8.75	1	1
Serine	9.15	1	1
Aspartic acid	9.82	1	2
Asparagine	8.86	1	1
Glutamic acid	9.96	1	2
Glutamine	8.96	1	1
Arginine	12.48	2	1
Lysine	10.53	2	1
Histidine	9.18	1	1
Tryptophan	9.39	1	1
Glycylglycine	8.25	1	1
Methylamine	10.62	1	1
Ethanolamine	9.50	1	1

(VI) 重水中での触媒効果

Merck Sharp & Dohme of Canada社の isotopic purity 99.7% 以上の純度を有する重水素水により pH 7.0 の緩衝溶液を調整し, glycine および methylamine の触媒効果について検討した。通常の緩衝溶液中におけるさきの結果と比較する意味で, 第15表に見かけの分解速度定数および触媒速度定数 (k_1) を示す。

第15表 Apparent Degradation Rate Constants (k_{app}) of FKI and Catalytic Rate Constants (k_1) of Glycine and Methylamine at pH 7.0 and 37°

Concn. ($10^{-2}M$)	k_{app} ($10^{-4}min^{-1}$)			
	Glycine		Methylamine	
	H ₂ O	D ₂ O	H ₂ O	D ₂ O
0	0.323	0.304	0.320	0.302
1	2.99	1.40	1.10	0.601
2	5.21	2.27	1.89	0.875
4	10.1	4.32	3.58	1.68
k_1	12.3	5.01	28.8	10.9

(1) (2) Isoniazid 誘導体の *in vitro* 抗菌活性

(i) *in vitro* 抗菌力試験法

(a) 試験菌および分注液の調製法

試験菌として武田薬工株式会社より分与された弱毒性牛型結核菌 *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) を小川培地にて継代培養したものを使用した。ほとんどの場合、菌令は14日目のものに統一し、これを秤量した後メノウ乳針中で擦りつぶし、 $1\text{mg (wet weight)}/\text{ml}$ となる懸濁液を調整した。この懸濁液に遠心操作を加え、得られた上清を分注液とした。

(b) 最少発育阻止濃度 (MIC) の検定法

各希釈系列の薬物溶液 1 ml 、Kirchner 培地 (pH 7.0) または Long 培地 (pH 6.0) 4 ml を培養試験管に分注し、これにさきの菌懸濁液上清を各 0.1 ml ずつ分注して培養検体とした。

培養はすべて 37°C ふ卵器中に行ない、MIC の検定は前者の培地で2週間後、後者の培地で3週間後に行った。これを含めて *in vitro* 抗菌力試験法においては雑菌の混入などを防止するため、オートクレーブと紫外線照射による滅菌処理ならびに無菌箱中での操作などによりすべて無菌条件下で実験した。

(c) 比濁法による薬物接触効果の検討

Barclay らの方法³³⁾ に準じた操作の概略を第16表に示す。

第16表 Test Method of BCG Exposure to Drug

add 10 ml of drug solution ($5 \times 10^{-4}\text{ M}$) to 30 ml of 4-day-old culture of BCG in 10% bovine serum containing Kirchner medium and expose for 2, 4, and 7 hours under incubation at 37°

↓

centrifuge the exposed tube at 3000 rpm for 15 min and remove the drug solution by decantation

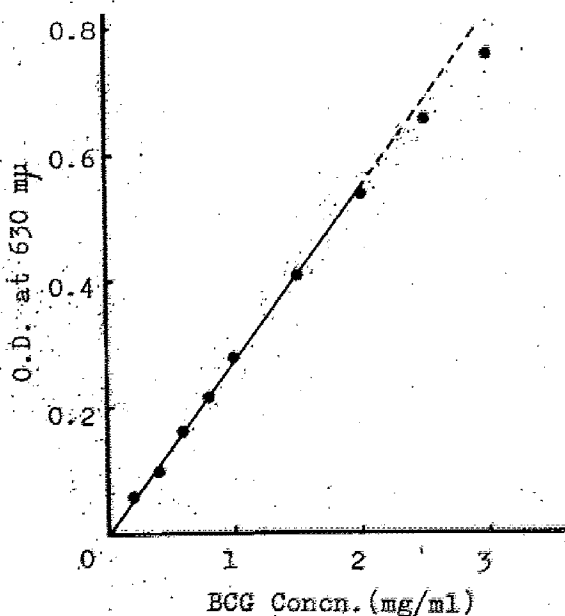
↓

wash the cells twice with 25 ml of fresh Kirchner medium and add 50 ml of the same medium to the drug-free cells

↓

incubate the cells at 37° and measure the bacterial growth daily by turbidity reading at $630\text{ m}\mu$

予め10%牛血清 Kirchner 培地中にて4日間培養を続けた菌体に対する接触効果を検討するとともに、菌令による差異を調べる目的で、別に2日間および7日間予備培養したものに対しても検討を加えた。なお、BCG濃度と濁度との関係は第3図に示すように、約2mg/mlまでにおいて直線関係が認められた。



第3図 Nephelometric Calibration Curve of BCG

(IV) MICの検定

(a) 各種N源による培養試験

asparagine を基準にした含N濃度がほぼ一定となるように、各種アミノ酸類およびその誘導体を假々に含む Kirchner 培地を調製し、薬物溶液を加えずに BCG の発育成績のみを検討した。培養結果を第17表に示す。

(b) Kirchner 培地および Long 培地によるMICの判定

各薬物、各培地についての培養試験による BCG の発育状況を第18表に示す。

第17表 Growth of BCG in Modified Kirchner Media
Containing Various N-Sources (g/L)

No. of Run	Growth Symbol ^{a)} after 2-Week-Incubation								
	Asp(10)	Asp(5) ^{b)}	Asp(2.5)	Na-Glu(10)	Gly(5)	N-Methyl Gly(7)	Glycyl Gly(5)	Arg(3)	Lys(5)
1	+++	++	+	+	±	-	-	-	-
2	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
3	+++	++	+	±	-	-	-	-	-

a) (+++) = Colonies covering the entire medium, (++) = Colonies covering about half of the medium, (+) = Colonies covering about a quarter of the medium, (±) = Slightly turbid medium, (-) = No growth

b) Medium corresponding to normal Kirchner medium

第18表 Growth of BCG in Kirchner(pH 7.0) and Long(pH 6.0)
Medium Containing INAH and Its Derivatives

Drug	No. of Run ^{a)}	Growth Symbol ^{b)} subjected to drug in concentration(10 ⁻⁸ M) of													
		200	160	120	80	40	20	16	12	8	4	2	1.6	1.2	0.8
INAH	K-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++
	K-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	++	++	++
	K-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	++	++	++
	L-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	++	++	++
	L-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	++	++	++
FKI	K-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	++	++	++
	K-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	++	++
	K-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	++	++
	L-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++
	L-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	++	++	++
GI	K-1	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++
	K-2	-	-	-	-	-	±	+	+	+	++	++	++	+++	+++
	K-3	-	-	-	-	-	±	+	+	+	++	++	++	++	+++
	L-1	-	-	-	-	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	L-2	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+++
NaPI	K-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	++	++	++
	K-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	++	++
	K-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	+	++
	L-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	++	++	++
	L-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	++	++

a) K and L indicate Kirchner and Long Medium, respectively

b) The same as summarized in Table 17

(III) 抗菌活性におよぼす時間的因子

培養中の各試料液を経時的に採取したものの濁度を第19表に示す。

第19表 Nephelometric Readings for the Growth of BCG Exposed to INAH and Its Derivatives

Exposure Time(hr)	Optical Density at 630 mμ (10 ³)																							
	INAH(day)					FKI(day)					GI(day)					NaPI(day)								
	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
0	31	49	72	109	150	193	31	49	72	109	150	193	31	49	72	109	150	193	31	49	72	109	150	193
2	31	41	48	62	76	105	29	43	49	63	77	112	31	46	60	89	112	145	30	39	54	77	104	138
4	30	36	37	46	52	71	31	38	43	53	61	83	30	44	50	65	79	107	28	37	47	61	72	89
7	30	32	32	34	36	48	30	30	34	37	40	52	31	37	42	46	54	81	29	30	34	38	41	52

総論の部における式(10)より計算した生存率を第20表に示す。なおm, nとしては対照検体が対数増殖期に入るところを選び³³⁾、それぞれ2および3日目とした。

第20表 Percentage of Surviving BCG Exposed to INAH and Its Derivatives

Exposure Time(hr)	% BCG Surviving			
	INAH	FKI	GI	NaPI
2	37.8	37.8	78.4	67.5
4	23.5	26.2	40.5	35.0
7	5.4	8.1	10.8	10.0

菌令の差異による影響に関しては薬物として INAH を選び検討した。その結果を第21表に示す。

第21表 Effect of Culture Age on Percentage of
Surviving BCG Exposed to INAH

Exposure Time(hr)	% Surviving BCG in Culture Age(day) of		
	2	4	7
2	39.0	37.8	37.4
4	25.1	23.5	23.6
7	5.2	5.4	4.9

第Ⅱ章 実験の部

(Ⅱ)-(1) Penicillin誘導体の安定性におよぼす銅イオンの影響

(1) 分解産物の同定

benzylpenicillin(BP)および2,6-dimethoxyphenylpenicillin(DM P)はそれぞれ武田薬工株式会社および明治製薬株式会社製の市販品を水-アセトン(9:1)系で再結晶して得たものを使用した。分解産物である benzylpenicillenic acid(BPE A), 2,6-dimethoxyphenylpenicillenic acid(DMPEA)ならびに benzylpenicilloic acid(BPOA), 2,6-dimethoxyphenylpenicilloic acid(DMPOA)は、それぞれ Levine¹⁰⁵⁾, Rapsonら¹⁰⁶⁾の方法を準用して得たものを標品とした。

第22表に示すリン酸緩衝溶液および10倍希釈ブイヨンについて Warningらの方法¹⁰⁷⁾に準じ金属イオン除去処理を施したものを反応溶液として用いた。薬物初濃度を 5×10^{-4} Mとし、添加銅イオンは CuCl_2 を用い緩衝溶液中および培地中でそれぞれ 1×10^{-7} M, 2×10^{-6} Mの濃度となるように各々溶解させた。この試料溶液を37℃恒温槽中にて反応させた。なおリン酸ブイヨンの基礎培地は市販品を使用した。

第22表 Medium Compositions (per L)

Media ^{a)}	
Buffer solution	1/10-Phosphate broth
	Phosphate broth(Nissan) 3.0g
0.05M $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$	K_2HPO_4 4.0g
	NaCl 4.0g

a) all adjusted at pH 5.0

(b) TCLによる検索

検体は約24~36時間さきの反応を行ったもの、標品は検体と同じ反応液に溶解させたものを用い、両者とも3mlをとりmethanol 1mlを加え混合したものを試料とした。条件は総論の部第22図に附記したとおりで、McGilberyらの方法¹⁰⁸⁾に若干の改変を加えたものである。

(b) 紫外吸収スペクトルの検討

分解産物であるBPEAおよびDMPEAの最大吸収波長(λ_{max})における吸光度の時間的推移を第23表に示す。

第23表 Absorbance Change of BPEA and DMPEA^{a)}

Time (hr)	BPEA(at 322 mμ)		DMPEA(at 332 mμ)	
	in buffer solution	in broth	in buffer solution	in broth
0	0	0	0	0
9	0.280	0.245	0.316	0.352
24	0.501	0.552	0.599	0.678
48	0.882	0.858	0.941	0.995
72	1.014	1.017	1.103	1.144
96	1.102	1.114	1.170	1.190
144	1.230	1.226	1.250	1.244
192	1.231	1.228	1.250	1.245

a) Initial concentration of BP and DMP= 5×10^{-4} M,
concentration of Cu^{2+} = 1×10^{-4} and 2×10^{-4} M in
buffer solution and broth, respectively

(II) 水溶液中での安定性

反応条件はさきの(I)項と全く同様とし、反応液組成のうち銅イオン濃度は $0 \sim 1 \times 10^{-5}$ Mの範囲で十一段階に調整した。試料溶液を経時的に採取し、直ちに定量を行った。

(a) 薬物の定量法

イ) BP

分解産物であるBPEAを322 mμにて吸光度の測定を行なうことにより定量した。

ロ) DMP

分解産物であるDMPEAを332 mμにて吸光度を測定することにより定量した

(b) 分解速度定数および半減期の計算

擬一次反応速度式に従うことから k_{app} および $t_{1/2}$ を求め、第24表に示す。

第24表 Apparent Degradation Rate Constants and Half-Lives of Penicillins in Buffer Solutions at pH 5.0 and 37°

Concn. of $\text{Cu}^{++}(\text{M})$	BP		DMP	
	$k_{\text{app}} (10^{-4} \text{min}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{min})$	$k_{\text{app}} (10^{-4} \text{min}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{min})$
0	2.73	2540	1.00	6930
3×10^{-8}	3.32	2090	2.12	3270
5×10^{-8}	4.33	1600	2.84	2440
1×10^{-7}	5.25	1320	4.47	1550
1.6×10^{-7}	6.41	1080	6.06	1140
2×10^{-7}	7.84	884	6.46	1070
3×10^{-7}	8.26	839	7.46	929
4×10^{-7}	8.38	827	7.91	876
5×10^{-7}	8.52	813	8.25	840
1×10^{-6}	8.53	812	8.48	817
1×10^{-5}	8.54	811	8.49	816

(III) 培地中での安定性

銅イオンの添加濃度を $0 \sim 1 \times 10^{-4} \text{ M}$ の範囲で十一段階に調整する以外は反応条件および定量法とも、(II)項と全く同様に行った。見かけの分解速度定数および半減期を第25表に示す。

(IV) 銅イオンの触媒効果および複合体形成効果

ここでは総論の部第25図、27図に関して、式(11)～(15)を利用することにより解析を行った。銅イオンを添加しないときの分解速度定数(k_0)、見かけの触媒速度定数($k_{\text{Cu}^{++}}$)、複合体の分解速度定数(k_c)はそれぞれ、縦軸の切片、直線的増加部分の勾配、水平部分の一定値と k_0 との差から求めることができる。一方、見かけの複合体形成定数(K_{app})は、第26表に示すように四段階の銅イオン濃度に関してさきの理論式により計算した。

第25表 Apparent Degradation Rate Constants and Half-Lives of Penicillins in Phosphate Broth at pH 5.0 and 37°

Concn. of Cu ⁺⁺ (M)	BP		DMP	
	k _{app} (10 ⁴ min ⁻¹)	t _{1/2} (min)	k _{app} (10 ⁴ min ⁻¹)	t _{1/2} (min)
0	1.62	4280	0.897	7730
5x10 ⁻⁷	1.89	3670	1.72	4030
8x10 ⁻⁷	2.18	3180	2.99	2320
1x10 ⁻⁶	2.51	2760	3.06	2260
2x10 ⁻⁶	4.02	1720	4.88	1420
5x10 ⁻⁶	7.02	987	6.65	1040
8x10 ⁻⁶	8.17	848	7.04	984
1x10 ⁻⁵	8.48	817	7.52	921
4x10 ⁻⁵	9.92	698	8.42	823
8x10 ⁻⁵	9.98	694	9.40	737
1x10 ⁻⁴	10.1	687	9.68	716

第26表 Apparent Stability Constants for Penicillin-Cu⁺⁺ System at pH 5.0 and 37°

in buffer soln.			in broth		
Concn. of Cu ⁺⁺ (10 ⁻⁷ M)	K _{app} (10 ³ M ⁻¹)		Concn. of Cu ⁺⁺ (10 ⁻⁶ M)	K _{app} (10 ³ M ⁻¹)	
	BP	DMP		BP	DMP
1.5	4.05	7.61	2.0	3.98	17.8
2.0	3.94	9.07	5.0	4.54	20.3
2.5	4.87	8.11	8.0	5.27	20.6
3.0	5.18	7.81	10.0	5.14	19.7
Mean	4.51	8.15	Mean	4.73	19.6

(V) 銅イオンの効果におよぼす培地成分などの影響

ここでは培地の主成分の濃度変化ならびにキレート剤添加の影響を検討した。

(a) 培地成分の影響

使用した培地の組成を第27表に示す。見かけの分解速度定数を第28表に示す。

第27表 Medium Compositions (g/li)

Constituent	Media ^{a)}		
	1/5-Broth	1/10-Broth	1/20-Broth
Phosphate broth (Nissan)	6.0	3.0	1.5
K ₂ HPO ₄	4.0	4.5	4.75
NaCl	4.0	4.5	4.75

a) all adjusted at pH 5.0

第28表 Apparent Degradation Rate Constants of BP
in Modified Broth at pH 5.0 and 37°

Concn. of Cu ⁺⁺ (M)	k _{app} (10 ⁴ min ⁻¹) in		
	1/5-Broth	1/10-Broth	1/20-Broth
0	1.59	1.62	1.68
3x10 ⁻⁷	1.60	1.70	1.94
5x10 ⁻⁷	1.63	1.89	2.27
8x10 ⁻⁷	1.78	2.18	2.56
1x10 ⁻⁶	2.15	2.51	2.90
2x10 ⁻⁶	3.64	4.02	4.36
5x10 ⁻⁶	6.88	7.02	7.19
8x10 ⁻⁶	8.03	8.17	8.31
1x10 ⁻⁵	8.39	8.48	8.51
1.4x10 ⁻⁵	8.97	9.01	9.14

(b) キレート剤添加の影響

銅イオンを 1×10^{-6} Mの濃度で含む0.05 Mリン酸緩衝溶液 (pH 5.0) に三種のアミノ酸および ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を各々 $0 \sim 3 \times 10^{-2}$ Mの濃度範囲で添加する条件で反応を行った。見かけの分解速度定数を第29表に示す。

第29表 Apparent Degradation Rate Constants of BP in the Presence of Cupric Ion^{a)} and Chelating Agents at pH 5.0 and 37°

Concn. of Chelating Agent (10^{-2} M)	k_{app} (10^{-4}min^{-1}) with			
	Gly	Try	His	EDTA
0	8.54	8.54	8.54	8.54
0.1	—	—	—	3.00
0.2	—	—	4.84	1.95
0.4	—	5.39	—	—
0.5	7.72	—	2.97	1.83
0.8	—	3.90	—	—
1.0	6.80	—	2.00	1.82
1.2	—	2.62	—	—
2.0	5.06	2.12	1.91	1.83
3.0	3.79	1.82	1.74	1.74

a) concentration = 1×10^{-6} M

(I)-(2) Penicillin 誘導体の *in vitro* 抗菌活性におよぼす銅イオンの影響

(i) MICの検定

試験菌として、京都大学医学部微生物学教室より分与された黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* FAD 209P-sensitive をリン酸ブイヨン寒天培地にて継代培養したものを用いた。

使用菌令は36~48時間目のものに統一し、分注菌液はリン酸ブイヨン中に 1mg (wet weight) / ml を含む懸濁液としたものを用いた。培養は各培養試験管を 37°C ふ卵器中にて2日間行った。

(a) 培地濃度の選定

塩濃度を一定とした各種濃度のリン酸ブイヨン (pH 5.0) 4 ml にさきの菌懸濁液を 0.2 ml 加えたものの菌発育成績を調べた。第 30 表に示す結果から明らかなように、10 倍希釈の培地でも発育が十分に良好であることが認められた。

第 30 表 Growth of *St. aureus* in Modified Phosphate Broth (pH 5.0)

No. of Run	Growth symbol ^{a)} after 48-hour-incubation in				
	1/20-broth	1/10-broth ^{b)}	1/5-broth	1/2-broth	Broth
1	±	+	+	++	++
2	-	+	+	+	++
3	-	+	+	+	+

a) The same as summarized in Table 17

b) Medium corresponding to that tested in Stability of drugs

(b) MIC の検定

銅イオンを $0 \sim 1 \times 10^{-5}$ M の濃度範囲で五段階となるように調整した 10 倍希釈リン酸ブイヨン培地 4 ml に各希釈系列の薬物溶液 1 ml および菌懸濁液 0.2 ml を加えたものを培養検体とした。*St. aureus* の発育状況を第 31 表に示す。

第31表 Growth of *St. aureus* in Phosphate Broth Containing Penicillins and Cupric Ion at pH 5.0 and 37°

Drug	Concn. of Cu ⁺⁺ (10 ⁻⁴ M)	No. of run	Growth symbol subjected to drug in concn. (10 ⁻⁴ M) of														
			800	600	400	200	100	50	20	10	5	2	1	0.5	0.2	0.1	0.05
BP	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
	0.01	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
	0.1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
	10	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
	100	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
DMF	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
	0.01	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
	0.1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
	10	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
	100	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++

(II) 抗菌活性におよぼす時間的因子

ここでは前章と同様に Barclay らの方法³⁸⁾に準じ、比濁法により薬物接触効果を検討した。操作の概略は第32表、菌濃度と濁度との関係は第4図に示すとおりである。菌令による差異を調べる目的で、別に6時間および24時間予備培養したものに対しても検討を加えた。まず12時間の菌令を用いて培養したものの濁度を第33表に示す。

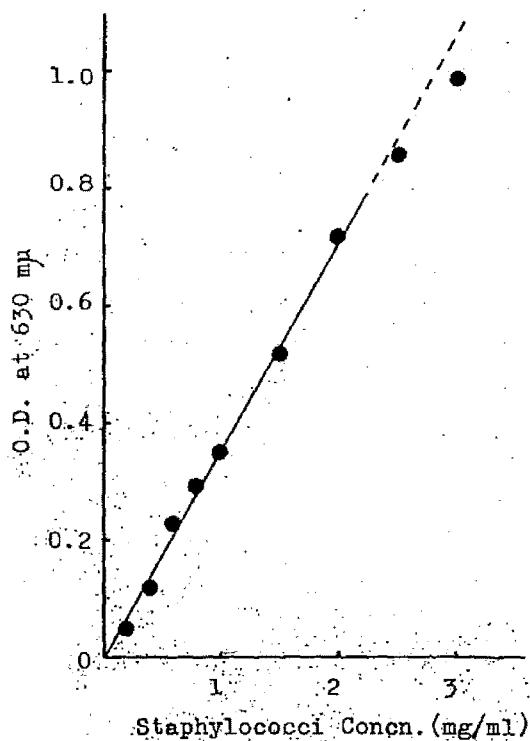
第32表 Test Method of *St. aureus* Exposure to Penicillins

add 10 ml of drug solution (1x10⁻⁴M) to 30 ml of 12-hour-old culture of Staphylococci in phosphate broth and expose for 0 to 8 hours under incubation at 37°

↓
centrifuge the exposed tube at 3000 rpm for 10 min and remove the drug solution by decantation

↓
wash the cells twice with 25 ml of fresh 1/10-phosphate broth and add 50 ml of the same medium to the drug-free cells

↓
incubate the cells at 37° and measure the bacterial growth periodically by turbidity reading at 630 mμ



第4図. Nephelometric Calibration Curve of *St. aureus*

第33表. Nephelometric Readings for the Growth of *St. aureus* Exposed to Penicillins

Exposure Time (hr)	Optical Density at 630 mμ (10 ⁻⁵)													
	BF (hr)							DMP (hr)						
	0	24	48	84	97	122	146	0	16	35	57	87	108	136
0 ^{a)}	61	83	125	204	257	392	519	60	69	101	135	200	310	457
0 ^{b)}	61	80	101	149	173	271	373	58	65	95	127	160	244	355
2	61	80	98	134	154	201	258	60	65	92	118	154	214	298
4	—	—	—	—	—	—	—	60	63	88	107	135	180	242
5	60	75	91	120	129	153	178	—	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—	—	59	60	75	95	117	145	192
8	60	63	65	68	71	78	96	—	—	—	—	—	—	—

a) No exposure(Control)
b) Instantaneous exposure

総論の部における式(10)より計算した生存率を第34表に示す。なおm, nとしてはBP, DMPについてそれぞれ, 97および122時間, 87および108時間目とした。

第34表 Percentage of Surviving *St. aureus* Exposed to Penicillins

Exposure Time(hr)	% Staphylococci Surviving	
	BP	DMP
0 ^{a)}	72.6	76.4
2	34.8	54.5
4	—	40.9
5	17.8	—
7	—	25.5
8	6.9	—

a) corresponding to 0' in Table 33

菌令の差異による影響に関しては薬物としてBPを選び検討した。その結果を第35表に示す。

第35表 Effect of Culture Age on Percentage of Surviving *St. aureus* Exposed to BP

Exposure Time(hr)	% Surviving Staphylococci in Age of (hr)		
	6	12	24
0	74.1	72.6	72.4
2	36.1	34.8	34.2
5	16.9	17.8	17.4
8	6.9	6.9	6.1

(III) 銅イオンの抗菌活性

10倍希釈ゾイオン中にて12時間予備培養を行った菌懸濁液に銅イオンを $0 \sim 1 \times 10^{-4}$ Mの

濃度範囲で六段階に変化させ添加した培養検体について、濁度の測定を行った。その結果を第36表に示す。さきの薬物接触時間の代りに銅イオンの各濃度を考慮し、m, nとしてそれぞれ9.6時間, 120時間目を取り、総論の部の式(10)を適用した。これよりpに相当する発育阻止率を求め総論の部第9表に示した。

第36表 Nephelometric Readings for the Growth of *St. aureus* Subjected to Cupric Ion

Concn. of $\text{Cu}^{++}(\text{M})$	Optical Density at 630 mμ after incubation of(hr)						
	0	24	48	72	96	120	144
0	60	83	125	184	257	392	529
1×10^{-7}	61	82	127	183	259	394	526
1×10^{-6}	60	85	128	187	254	388	517
1×10^{-5}	60	81	123	180	252	382	508
5×10^{-5}	58	76	102	138	177	298	424
1×10^{-4}	52	71	96	117	145	221	316

($\times 10^{-3}$)

(IV) 複合体形成による脂溶性の増加

ここでは銅イオンの共存による薬物の分配係数の変化について検討した。相互溶解を予め平衡に致らしめた0.05Mリン酸緩衝溶液(pH 5.0)および isoamyl alcohol を等量ずつ用いて常法により分配係数の測定を行った。なお分解による濃度の減少を防止する目的で、薬物初濃度は $1 \times 10^{-2} \text{M}$ とし振とう操作は5℃にて行った。薬物の定量は緩衝溶液中の濃度をヒドロキサム酸法¹⁰⁹⁾に準じて求めることにより実施した。次式から計算された分配係数を総論の部第10表に示す。

$$\text{分配係数} = \frac{(\text{緩衝溶液中の濃度}) - (\text{振とう後の緩衝溶液中の濃度})}{(\text{振とう後の緩衝溶液中の濃度})}$$

第Ⅱ章 実験の部

(Ⅱ)-(1) Nitrofurantoin 誘導体の菌体共存下での消失挙動

(i) 培地中での安定性

薬物は総論の部第11表に記述した十二種を選び、すべて大日本製薬株式会社より分与されたものを用いた。培地には主として5倍希釈リン酸ブイヨン(pH 7.0)を使用した。

本章で使用する他の培地なども含めてその組成を第37表に示す。

第37表 Compositions of Culture Media

Component	Media ^{a)}		
	Phosphate broth ^{b)}	Phosphate buffer medium	Synthetic medium
Phosphate broth(Nissan)	6.0 g		
K ₂ HPO ₄	4.0 g		
KH ₂ PO ₄		4.54 g	4.54 g
NaCl	4.0 g	5.00 g	5.00 g
Glucose			2.25 g
L-Arginine hydrochloride			1.91 g
Distd. water	1000 ml	1000 ml	1000 ml

a) all adjusted at pH 7.0

b) corresponding to 5-fold diluted one

薬物の初濃度はすべて 4×10^{-5} M とし、37℃恒温槽中にて反応させ、経時的に試料溶液を採取したものを定量に供した。なお、薬物の光分解による消失を防止するため、本章での反応および定量操作などはすべて遮光条件下にて行った。

(a) 薬物の定量法

イ) ビニル結合体

採取した試料溶液1～2 mlに chloroform 4～5 mlを加え、5分間の振とう抽出後、chloroform層の薬物濃度を吸光度測定により定量した。

ロ) アゾメチン結合体および他の三種

chloroformの代りに ethyl acetate を用いる以外はビニル結合体の場合と全く同様に行った。

なお、各薬物の最大吸収波長をまとめて第38表に示す。

第38表 Maximum Absorption Wave-length of Nitrofurans

Compound	$\lambda_{\max}(\text{m}\mu)$	Compound	$\lambda_{\max}(\text{m}\mu)$
NF-148	260	NFT	270
NF-153	420	MF	267
NF-253	263	NF-501	290
NF-305	268	NF-425	316
NF-320	306	NF-434	320
NF-323	388	NF-240	318

(b) 分解速度定数および半減期の計算

総論の部第3.3図に示すように、分解は見かけ上、擬一次反応速度式に従うことが明らかとなり、容易に k_{app} と $t_{1/2}$ とが求められる。これらを総論の部第1.2表に示した。

(II) 菌体共存下での消失現象

試験菌として、前章で用いた *Staphylococcus aureus* FAD 209P-sensitive および大日本製薬株式会社より分与された *Staphylococcus aureus* FAD 209P Jc-1 Fz25-resistant の二種を使用した。菌令はいずれも24時間とした。5倍希釈リン酸ブイヨン中に薬物および試験菌をそれぞれ $4 \times 10^{-5} \text{M}$, $0.2 \text{mg}(\text{wet weight})/\text{mL}$ の濃度で含有する試料溶液を調整し、37℃恒温槽中にて反応させた。

(a) 薬物の定量法

さきの(1)の(n)項と全く同様に行った。

(b) 感受性菌共存による消失

各薬物の残存率を計算してまとめたものを第39表に示す。

第39表 Percentage of Nitrofurans Remaining in Phosphate Broth Suspended with *St. aureus* -sensitive (0.2mg/ml) at pH 7.0 and 37°

Time (min)	% remaining of										
	NF-148	NF-153	NF-253	NF-320	NF-323	NFT	NF	NF-501	NF-425	NF-434	NF-240
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
5	84.1	79.0	87.7	88.3	84.1	94.6	92.0	91.9	—	—	—
10	77.6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15	—	65.9	76.9	82.0	75.8	89.7	87.6	87.1	99.1	99.3	99.7
20	69.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
30	62.7	52.9	68.5	73.1	67.5	86.5	80.0	81.3	—	—	—
60	51.3	36.5	61.0	66.3	59.0	83.0	69.9	71.8	98.6	98.6	99.4
90	42.2	24.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
120	35.8	15.3	—	—	46.5	—	61.1	63.3	97.2	98.0	98.9
130	—	—	46.3	—	—	—	—	—	—	—	—
150	—	—	—	47.0	—	74.9	—	—	—	—	—
180	25.7	—	—	—	—	—	52.5	54.8	96.0	96.1	98.2
190	—	—	38.4	—	—	—	—	—	—	—	—
200	—	—	—	—	34.4	—	—	—	—	—	—
210	—	—	—	38.9	—	71.0	—	—	—	—	—
240	—	—	—	—	—	—	45.8	47.6	94.8	94.4	97.1
270	—	—	28.6	31.4	—	67.4	—	—	—	—	—

(c) 耐性菌共存による消失

各薬物の残存率を計算してまとめたものを第40表に示す。総論の部第35図から明らかなように、消失は見かけ上擬一次反応速度式に従うことが認められたので、見かけの消失速度定数を計算し第41表に示す。

第40表 Percentage of Nitrofurans Remaining in Phosphate Broth Suspended with *St. aureus* -resistant (0.2mg/ml) at pH 7.0 and 37°

Time (hr)	% remaining of											
	NF-148	NF-153	NF-253	NF-305	NF-320	NF-323	NFT	NF	NF-501	NF-425	NF-434	NF-240
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
2	98.7	99.8	99.9	99.4	98.6	99.5	96.7	97.1	99.6	99.3	99.5	99.5
4	97.1	99.6	99.7	98.9	96.8	99.2	93.5	94.3	99.3	98.2	99.4	99.1
8	94.2	99.0	99.2	97.4	93.9	98.5	87.5	89.0	98.0	96.2	97.9	98.4
12	91.5	98.6	98.9	96.5	91.0	97.9	81.9	83.7	97.1	93.9	97.0	97.9
24	83.6	96.4	97.5	92.6	82.3	94.8	66.5	69.3	93.5	88.0	93.4	94.9
35	77.0	94.9	96.5	89.1	75.3	92.4	55.0	58.4	90.8	82.9	91.0	92.2

第41表 Apparent Rate Constants and Half-Lives for
the Disappearance of Nitrofurans in
Phosphate Broth Suspended with *St. aureus*
-resistant at pH 7.0 and 37°

Nitrofurans	k_{app} (10^{-2} hr $^{-1}$)	$t_{1/2}$ (hr)
NF-148	0.728	95.2
NF-153	0.149	465
NF-253	0.102	679
NF-305	0.330	210
NF-320	0.815	85.0
NF-323	0.226	307
NFT	1.71	40.5
MF	1.54	45.0
NF-501	0.272	255
NF-425	0.536	129
NF-434	0.270	257
NF-240	0.226	307

(四) 消失におよぼす菌体濃度の影響

NF-153 の初濃度を 4×10^{-5} M とし、菌濃度を $0 \sim 0.2$ mg/ml の範囲で七段階に変化させた時の残存率を第42表に示す。なお、他の薬物についてもほぼ同様の結果が得られ、後述の(Ⅷ),(Ⅸ)項において解析を行う。

第42表 Percentage of NF-153 Remaining in Phosphate
Broth Suspended with Various Quantity of
St. aureus at pH 7.0 and 37°

Time (min)	% remaining of drug with Staphylococci in concn. (mg/ml) of						
	0	0.01	0.02	0.05	0.10	0.15	0.20
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
20	—	—	—	—	—	—	69.8
30	—	95.7	93.2	89.2	81.1	74.3	62.1
60	—	93.9	89.0	79.7	65.2	53.4	51.2
90	—	91.8	86.8	74.0	57.9	42.9	40.4
120	—	90.9	84.9	69.4	49.3	32.3	26.1
180	—	89.9	83.5	57.6	34.2	—	—
240	97.8	88.2	79.2	49.4	—	—	—
650	96.7	83.0	68.3	—	—	—	—
1080	94.2	78.1	59.0	—	—	—	—

(IV) 消失におよぼす薬物の初濃度の影響

ここでは菌濃度を 0.1 mg/ml で一定とし、NF-153 および NFT を $2 \times 10^{-5} \sim 16 \times 10^{-4} \text{ M}$ の範囲で四段階に変化させて検討した。残存率は第43表に示すとおりである。これを図示した総論の部第37図の直線部分に関し Lineweaver-Burk の理論式を応用する際の各パラメーターを第44表に示す。ここで基質薬物濃度(S)は直線部分の縦軸との外挿点から得られ、速度は前者と見かけ速度定数との積から得られる値である。

第43表 Effect of Initial Drug Concentration on Percentage of Remaining in Phosphate Broth Suspended with *St. aureus* (0.1 mg/ml) at pH 7.0 and 37°

% remaining of drug in concn. ($10^{-5}M$) of									
NF-153					NFT				
Time (min)	2	4	8	16	Time (min)	2	4	8	16
0	100.0	100.0	100.0	100.0	0	100.0	100.0	100.0	100.0
20	80.0	88.1	93.9	97.4	20	93.7	94.2	94.9	95.4
30	66.2	81.8	88.1	95.2	30	90.6	91.8	92.7	93.6
100	33.5	55.6	77.2	84.9	60	83.6	86.2	88.9	91.2
180	15.4	33.6	62.9	78.1	120	74.4	76.3	86.1	89.0
300	—	19.2	49.7	71.0	240	57.3	61.9	75.0	80.2
420	—	—	38.0	64.2	360	45.3	50.6	67.1	76.9
					480	38.4	42.7	64.0	74.0

第44表 Analysis of Parameters for Lineweaver-Burk's Equation

	NF-153				NFT			
S (10^5 M)	1.46	3.46	7.06	1.38	1.72	3.38	7.49	14.9
1/S (10^4 M^{-1})	6.85	2.93	1.42	0.73	5.81	2.96	1.34	0.67
V ($10^7 \text{ min}^{-1} \text{ M}$)	1.19	1.54	1.84	1.99	0.31	0.43	0.50	0.53
1/V (10^7 min M^{-1})	0.84	0.65	0.54	0.50	3.64	2.35	2.01	1.87

(V) 消失におよぼす培地成分の影響

培地の組成はさきの第37表に示すとおりであり、NF-148 および NFT の初濃度を $4 \times 10^{-5} \text{ M}$

とし、菌濃度を 0.2 mg/ml として検討した。残存率を第45表に示す。

第45表 Percentage of Nitrofurans Remaining in Various Media Suspended with *St. aureus* (0.2 mg/ml) at pH 7.0 and 37°

Time (min)	NF-148 in			Time (min)	NFT in		
	PBS	SM	PBM		PBS	SM	PBM
0	100.0	100.0	100.0	0	100.0	100.0	100.0
5	98.0	92.5	—	5	—	—	94.6
10	—	—	77.6	10	—	96.3	—
15	—	85.2	—	15	97.9	—	89.7
20	—	—	69.8	30	96.2	89.9	86.5
30	95.5	75.5	62.7	60	93.9	79.8	83.0
60	95.2	58.4	51.3	120	91.0	66.1	—
90	—	—	42.2	150	—	—	74.9
120	93.0	37.8	35.8	180	89.9	54.2	—
180	91.1	24.7	25.7	210	—	—	71.0

a) PBS: Phosphate buffer solution, SM: Synthetic medium, PBM: Phosphate broth medium

(VI) 消失におよぼす *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) の影響

5倍希釈リン酸ブイオン中にて、NF-148の初濃度を $4 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、菌濃度を 0.2 mg/ml とし、PCMBの添加濃度は $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ として検討した。添加は、反応開始時および予め35分前から菌懸濁液のみに共存させるという二種の方法をとった。残存率を第46表に示す。

第46表 Effect of PCMB on Percentage of NF-148
Remaining in Phosphate Broth Suspended
with *St. aureus* (0.2mg/ml) at pH 7.0 and 37°

Time (min)	no addition	addition of PCMB($1 \times 10^{-4}\text{M}$) at 0-time	preloading of PCMB($1 \times 10^{-4}\text{M}$) at 35min before the run
0	100.0	100.0	100.0
10	77.6	91.0	99.4
20	69.8	87.3	99.2
30	62.7	86.4	99.4
60	51.3	83.9	98.1
120	35.8	80.0	96.0
180	25.7	77.2	94.8

(Ⅶ) 薬物の菌細胞壁への結合

(a) 菌細胞壁の調整法

細胞壁分画法は Cumnis ら¹¹⁰⁾, 小谷ら¹¹¹⁾の方法に準ずる操作で行ない, その概略を第47表に示した。得られた細胞壁分画を24時間デシケーター中にて冷却下で放置後, 試料として用いた。

(b) 菌細胞壁分画の共存における消失

細胞壁分画を $0.8\text{mg (wet weight)}/\text{ml}$ の濃度で懸濁させた5倍希釈リン酸ブイヨン中で NF-148, NF-153, NF-323, NPT の四者について検討した。薬物の初濃度は $1.2 \times 10^{-5}\text{M}$ とした。残存率を第48表に示す。

(c) 菌細胞壁への結合

1) 結合におよぼす培地成分および PCMB の影響

細胞壁分画を $2.5\text{mg}/\text{ml}$ で含む培地, 薬物を $8 \times 10^{-5}\text{M}$ の濃度で含む培地をそれぞれ内液 (2ml), 外液 (4ml) として, cellulose tubing (Visking 社製, $8/32$ インチ 直径 0.7cm) を使用する平衡透析法により検討した。いずれの試料についても 37°C 恒温槽中に

て16~33時間放置し平衡に達せしめた後、漿物の定量を行い結合率を計算した。

第47表 Method of Fractionation of *Staphylococcal* Cell Walls

cell suspension of 48-hour-old culture (10 g wet weight per 10 ml of 0.067M phosphate buffer solution, pH 7.8)	
added with 10 g of glass beads (100 to 150 mesh) and disintegrated by ultrasonic oscillation with Kubota Ultrasonic Generator KMS-250 for 20 min (output voltage: 120)	
disintegrated cell suspension	
centrifuged 2 times at $400 \times g$ for 20 min after decanting the suspension which was added later with the washings	
supernatant fluid	precipitate
centrifuged at $4200 \times g$ for 60 min	(unbroken cells or clumps of cell walls)
precipitate	supernatant
	(soluble or particle fraction)
resuspended in 40 ml of the buffer solution containing crystalline trypsin (0.1 mg per 1.0 of turbidity reading at 550 m μ) and incubated at 40° for 60 min before the centrifugation at $9500 \times g$ for 20 min	
precipitate	
washed 2 times with the buffer solution and distilled water and centrifuged at $9500 \times g$ for 30 min	
cell wall fraction (crude membrane fraction)	

第48表 Percentage of Nitrofurans Remaining in Phosphate Broth Suspended with *Staphylococcal* Cell Walls (0.8 mg/ml) at pH 7.0 and 37°

Time (min)	NF-148	NF-153	NF-323	NFT
0	100.0	100.0	100.0	100.0
10	—	91.0	—	—
15	91.8	—	91.2	93.7
30	84.6	80.9	89.8	89.9
60	73.5	67.9	77.4	84.0
120	57.3	—	59.9	71.4
125	—	46.1	—	—
175	48.3	—	47.0	—
180	—	32.2	—	57.0

NF-148 に関する各種培地中での結合率を総論の部第12表に示した。なお PCMB の影響を検討する際は、内、外液の濃度が $1 \times 10^{-4} M$ となるように添加した。

ロ) 各薬物の結合率の比較

合成培地を用い四種の薬物の結合率を求めた結果を、総論の部第13表に示す。

(Ⅳ) 薬物と菌細胞内成分との相互作用

(a) 細胞内の可溶性・顆粒画分による消失

さきの第47表に示した操作により得られる上清液(可溶性・顆粒画分)を5倍希釈リン酸ブイオンで希釈し、当初の菌体濃度に換算して $0.1 mg/ml$, $0.2 mg/ml$ となるように調整した培地中において NF-153 および NFT の消失を検討した。両薬物の残存率を第49表に示す。なお、薬物の初濃度はいずれも $4 \times 10^{-5} M$ とした。

第49表 Percentage of Nitrofurans Remaining in Phosphate Broth Containing Subcellular Fraction of *St. aureus* at pH 7.0 and 37°

Time (min)	% remaining of drug with subcellular fraction corresponding to initial cell concn. (mg/ml) of			
	NF-153		NFT	
	0.1	0.2	0.1	0.2
0	100.0	100.0	100.0	100.0
30	93.7	81.8	99.0	98.3
60	86.4	68.6	98.4	97.1
120	72.9	45.1	96.5	94.0
180	63.1	—	94.1	90.8
240	54.8	—	92.3	87.9

(b) 相互作用の解析

さきのⅣ項で述べた消失におよぼす菌体濃度の影響に関して、直線的消失部分から求められる見かけの速度定数を第50表に示す。

総論の部第43図はこれを図示したものである。ここで式(1)と同様の次式が適用され、菌体による見かけの触媒速度定数 (k_{cell}) を計算することができる。

$$k_{app}(NF) = (k_0 + k_{cell}) (NF)$$

第50表 Apparent Rate Constants for the Linear Disappearance of Nitrofurans in Phosphate Broth Suspended with Various Quantity of *St. aureus* at pH 7.0 and 37°

Concn. of Cells(mg/ml)	k_{app} ($10^{-4}hr^{-1}$) of						
	NF-148	NF-153	NF-253	NF-320	NFT	MF	NF-501
0	0.0498	0.0078	0.0051	0.0624	0.137	0.122	0.0216
0.01	0.180	0.301	—	—	—	—	—
0.02	0.390	0.603	0.216	0.225	—	—	—
0.04	—	—	—	—	—	0.349	0.581
0.05	0.812	1.250	0.575	0.541	0.315	—	—
0.10	1.59	2.49	1.15	1.08	0.462	0.702	1.25
0.15	2.55	4.32	1.65	1.56	0.521	—	—
0.20	2.88	5.95	2.02	1.97	0.531	1.17	2.42

(Ⅳ) 安定性におよぼす L-cysteine の影響

薬物の初濃度を $4 \times 10^{-5} M$ とし, L-cysteine を $0 \sim 6 \times 10^{-3} M$ の範囲で七段階に調整した5倍希釈リン酸ブイオンを用いて検討した。得られた見かけの消失速度定数を第51表に示す。

さきの(Ⅲ)項の結果と同様に次式が適用でき, L-cysteineによる見かけの触媒速度定数

(k_{SH})をさきの k_{cell} とともに総論の部第14表に示した。

$$k_{app}(NF) = (k_0 + k_{SH})(NF)$$

第51表 Apparent Rate Constants for the Degradation of Nitrofurans in Phosphate Broth Added with L-Cysteine at pH 7.0 and 37°

Concn. of L-Cys($10^{-3}M$)	k_{app} ($10^{-4}hr^{-1}$) of						
	NF-148	NF-153	NF-253	NF-320	NFT	MF	NF-501
0	0.0498	0.0078	0.0051	0.0624	0.137	0.122	0.0216
0.4	—	0.468	—	—	—	—	—
1.0	—	1.04	—	—	—	—	—
2.0	1.44	2.45	1.24	1.34	0.270	0.324	0.504
3.0	—	3.55	—	—	—	—	—
4.0	2.54	—	2.15	2.61	0.384	0.588	0.980
6.0	3.55	—	3.44	3.93	0.504	0.756	1.50

(10)-(2) Nitrofurans 誘導体の *in vitro* 抗菌活性

(I) 感受性菌に対するMICの検定

培地として5倍希釈リン酸ブイヨン(pH 5.0)を使用し、菌懸濁液の分注容量を0.1mlとし、いずれの操作をも遮光条件下で行うこと以外はすべて前章における方法に準じて検討した。2日間培養後の菌発育状況を第52表に示す。なお、NF-425、NF-434、NF-240における最高の濃度はいずれもほぼ飽和溶解度を示すものである。

(II) 耐性菌に対するMICの検定

さきと全く同様にして検討し、菌発育状況の結果を第53表に示す。ここで試験した最高濃度はいずれもほぼ飽和溶解度となるものである。

第52表 Growth of *St. aureus* -sensitive in Phosphate Broth Containing Nitrofurans at pH 7.0 and 37°

Drug	No. of run	growth symbol subjected to drug in concn. (10 ⁻⁴ M) of															
		100	50	40	20	10	8	6	4	2	1.6	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1
NF-148	1	nt	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
	2	nt	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
NF-153	1	nt	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
	2	nt	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
NF-320	1	nt	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++	++
	2	nt	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	+	++
NF-323	1	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++	++
	2	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++
NFT	1	nt	nt	nt	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
	2	nt	nt	nt	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
NF	1	nt	nt	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
	2	nt	nt	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++
NF-501	1	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++	++	++
	2	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	++	++
NF-425	1	nt	+	+	+	+	+	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++
	2	nt	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
NF-434	1	nt	nt	nt	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	2	nt	nt	nt	+	+	+	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++
NF-240	1	+	+	+	+	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	2	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

nt : not tested

第53表 Growth of *St. aureus*-resistant in Phosphate Broth
Containing Nitrofurans at pH 7.0 and 37°

Drug	No. of run	growth symbol subjected to drug in concn. (10^5 M) of												
		100	50	40	20	10	8	6	4	2	1.6	1	0.8	0.6
NF-153	1	nt	nt	-	-	±	+	±	+	++	++	++	++	++
	2	nt	nt	-	-	±	+	+	+	+	++	++	++	++
NF-320	1	nt	nt	±	+	+	+	++	+	++	++	++	++	++
	2	nt	nt	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++
NET	1	nt	nt	nt	±	+	+	+	+	++	++	++	++	++
	2	nt	nt	nt	+	++	++	+	+	++	++	++	++	++
NF-501	1	nt	+	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++
	2	nt	+	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
NF-425	1	nt	+	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++
	2	nt	+	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++

引用文献

- 1) E. Grundberg and R. J. Schnitzer, Quart. Bull. Sea View Hosp., 13, 3 (1952)
- 2) 藤原, 薬学雑誌, 78, 1034, 1040, 1045, 1049 (1958)
- 3) 中垣ら, 薬学雑誌, 83, 781 (1963)
- 4) C. A. Colwell and A. R. Hess, Am. Rev. Tuberc. Pulmonary Diseases, 73, 892 (1957)
- 5) 金井ら, 結核 38, 512 (1966)
- 6) 掛見ら, 薬学雑誌, 91, 95 (1971)
- 7) E. Levin and J. G. Hirsch, Am. Rev. Tuberc., 71, 732 (1955)
- 8) Z. Simáne and H. Polanka, Rozhledy Tuberk., 19, 712 (1959)
- 9) N. F. Poole and A. E. Meyer, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 104, 560 (1960)
- 10) 戸井田, 結核, 37, 85, 287 (1962)
- 11) M. Wenzel, Naturwiss., 42, 370, 424 (1955)
- 12) M. Wenzel, Arzneim.-Forsch., 6, 58 (1956)
- 13) M. Wenzel, *ibid.*, 7, 662 (1957)
- 14) A. Defranceschi and V. Zamboni, Bioch. Biophys. Acta, 13, 304 (1954)
- 15) Z. Simáne, Arzneim.-Forsch., 9, 441 (1959)
- 16) J. G. Chalmers, Bioch. J., 89, 41 (1963)
- 17) R. C. R. Barreto and S. D. Sabino, J. Chromatog., 13, 435 (1964)
- 18) J. N. Brønsted and K. J. Pederson, Z. Physik. Chem. (Leipzig), 108, 185 (1923)
- 19) K. J. Laidler, "Reaction Kinetics", Pergamon Press (London), 1963, vol. II, p64
- 20) A. A. Frost and P. G. Pearson, "Kinetics and Mechanisms", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1966, p218
- 21) T. C. Bruice and S. J. Benkovic, "Bioorganic Mechanisms",

- W. A. Benjamin, Inc., New York, 1966, vol. 1, pp 32-37
- 22) S. D. Ross, M. Finkelstein and R. C. Peterson, J. Am. Chem. Soc., 81, 5336 (1959)
 - 23) W. R. Barclay, D. Koch-Weser and R. H. Ebert, Am. Rev. Tuberc., 67, 490 (1953)
 - 24) W. R. Barclay, D. Koch-Weser and R. H. Ebert, *ibid.*, 70, 784 (1954)
 - 25) 東村, 医学と生物学, 63, 24 (1962)
 - 26) 東村, 結核, 38, 94 (1963)
 - 27) 米田, 生体の科学, 4, 32 (1953)
 - 28) 山田, 最近医学, 7, 102 (1952)
 - 29) 平岡, 薬学雑誌, 79, 1343 (1959)
 - 30) 宮武ら, 薬学雑誌, 75, 1066 (1955)
 - 31) E. Genazzani and A. Paoletti, Minerva Med., 49, 4951 (1958)
 - 32) 岡ら, 日本胸部臨床, 21, 450 (1962)
 - 33) W. R. Barclay and E. Winberg, Am. Rev. Respirat. Diseases, 90, 749 (1964)
 - 34) K. Ichikawa, Nagoya J. of Med. Sci., 20, 81 (1957)
 - 35) K. Shoji, A. Yamagami and T. Mori, Med. J. of Osaka Univ., 7, 787 (1957)
 - 36) 山村, 結核, 27, 450 (1962)
 - 37) F. P. Doyle, J. H. C. Nayler, H. Smith and E. R. Stove, Nature, 193, 1091 (1961)
 - 38) F. P. Doyle, A. A. W. Long, J. H. C. Nayler and E. R. Stove, *ibid.*, 193, 1183 (1961)
 - 39) M. A. Schwartz, A. P. Granatek and F. H. Buckwalter, J. Pharm. Sci., 51, 523 (1962)
 - 40) M. A. Schwartz and F. H. Buckwalter, *ibid.*, 51, 1119 (1962)
 - 41) M. A. Schwartz, *ibid.*, 54, 472 (1965)
 - 42) J. F. Gallelli, Am. J. Hosp. Pharm., 24, 425 (1967)

- 43) J. P. Hou and J. W. Poole, J. Pharm. Sci., 58, 447 (1969)
- 44) M. A. Schwartz, *ibid.*, 57, 1209 (1968)
- 45) M. A. Schwartz, J. Med. Chem., 12, 36 (1969)
- 46) M. A. Schwartz, J. Pharm. Sci., 54, 1308 (1965)
- 47) M. A. Schwartz and G. R. Pflug, *ibid.*, 56, 1459 (1967)
- 48) R. D. Kinget and M. A. Schwartz, *ibid.*, 57, 1916 (1968)
- 49) R. D. Kinget and M. A. Schwartz, *ibid.*, 58, 1102 (1969)
- 50) P. J. Niebergall, D. A. Hauser, W. A. Cressman, E. T. Sugita and J. T. Doluisio, J. Pharm. Pharmacol., 18, 729 (1966)
- 51) W. A. Cressman, E. T. Sugita, J. T. Doluisio and P. J. Niebergall, *ibid.*, 18, 801 (1966)
- 52) W. A. Cressman, E. T. Sugita, J. T. Doluisio and P. J. Niebergall, J. Pharm. Sci., 58, 1510 (1969)
- 53) J. P. Hou and J. W. Poole, J. Pharm. Sci., 58, 447 (1969)
- 54) T. C. Butler, K. H. Dudley and D. Johnson, J. Pharmacol. Exptl. Therap., 181, 201 (1972)
- 55) M. A. Schwartz and W. Hayton, J. Pharm. Sci., 61, 906 (1972)
- 56) A. Weiss, S. Fallab and H. Erlenmeyer, Helv. Chim. Acta, 40, 611 (1957)
- 57) C. B. Monk, Trans Faraday Soc., 47, 285, 292, 297 (1951)
- 58) R. M. Izatt, W. C. Fernelius and B. P. Block, J. Phys. Chem., 59, 80 (1955)
- 59) A. Albert, Bioch. J., 54, 646 (1953)
- 60) G. Schwarzenbach, G. Gut and G. Anderegg, Helv. Chim. Acta, 37, 937 (1954)
- 61) J. Johnson, H. Clarke and R. Robinson, "The Chemistry of Penicillin", Princeton University Press, Princeton, N. J., 1949, p 421
- 62) D. J. Tipper and J. L. Strominger, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., 54, 1133 (1965)

- 63) B. F. Erlanger and L. Good, *Nature*, 200, 183 (1967)
- 64) H. J. Rogers, *ibid.*, 200, 31 (1967)
- 65) L. N. Johnson, *Proc. Roy. Soc. B.*, 167, 439 (1967)
- 66) J. Collins, *ibid.*, 167, 441 (1967)
- 67) H. Federsenfeld and R. E. Handschumacher, *Mol. Pharmacol.*, 3, 153 (1967)
- 68) H. J. Rogers, *Biochem. J.*, 103, 90 (1967)
- 69) W. E. Wick, *J. Bacteriol.*, 87, 1162 (1964)
- 70) 氏家, 日本細菌学雑誌, 10, 771 (1955)
- 71) 氏家, 日本細菌学雑誌, 10, 823 (1955)
- 72) K. E. Price, A. Gourevitch and L. C. Cheney, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1966, 670
- 73) G. L. Biagi, M. C. Guerra, A. M. Barbaro and M. F. Gamba, *J. Med. Chem.*, 13, 511 (1970)
- 74) R. E. Asnis, *Arch. Biochem. Biophys.*, 66, 208 (1957)
- 75) S. Oka, *Ag. Biol. Chem. (Tokyo)*, 26, 520 (1962)
- 76) 奥津ら, 日本水産学会誌, 30, 147 (1964)
- 77) J. Uriah and A. del Pozo Galencia Acta(Madrid), 19, 137 (1966)
- 78) 掛見ら, 薬剤学, 27, 301 (1967)
- 79) P. M. Theus, *Arch. Phar. (Weinheim)*, 1968, 301, 412
- 80) 才川, 薬学雑誌, 84, 121 (1964)
- 81) 松田, 醸酵工学, 44, 495 (1966)
- 82) 水成, *Chemotherapy*, 16, 86 (1968)
- 83) E. Boyland and B. E. Speyer, *Biochem. J.*, 119, 463 (1970)
- 84) H. Lineweaver and D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658 (1934)
- 85) B. L. Hutchings, *Biochim. Biophys. Acta*, 174, 734 (1969)
- 86) J. R. Dezeuw, *J. Bacteriol.*, 95, 498 (1968)
- 87) T. J. Franklin and B. Higginson, *Biochem. J.*, 116, 287 (1970)
- 88) 鈴木, 北海道医学雑誌, 36, 69 (1961)

- 89) H. Hurni, H. U. Gubler and R. Fischer, *Arzneim.-Forsch.*, 14, 1306 (1964)
- 90) J. K. Landquist and A. R. Martin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1964, 591
- 91) D. Nardi, E. Massarani, A. Tajana, L. Degen and M. J. Magistretti, *J. Med. Chem.*, 10, 530 (1967)
- 92) H. Hein *Med. Welt*, 1967, 2115
- 93) M. F. Paul, C. Harrington, R. C. Bender, E. Nohle and M. J. Bryson, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 125, 941 (1967)
- 94) H. Hein, *Arzneim.-Forsch.*, 19, 1579 (1969)
- 95) D. R. McCalla, A. Reuvers and C. Kaiser, *J. Bacteriol.*, 104, 1126 (1970)
- 96) R. Albrecht, H.-J. Kessler and E. Schröder, *Arzneim.-Forsch.*, 21, 127 (1971)
- 97) W. E. Waterbury, J. Boydstun, A. G. Castellani, R. Freedmen and J. J. Gavin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1965, 339
- 98) H. Zinner and W. Bock, *Chem. Ber.*, 89, 1124 (1957)
- 99) W. Diller, E. Krüger-Thiemer and E. Wempe, *Arzneim.-Forsch.*, 9, 432 (1959)
- 100) 藤原, *薬学雑誌*, 78, 1084 (1958)
- 101) 掛見ら, *薬学雑誌*, 82, 195 (1962)
- 102) A. Albert and E. P. Serjeant, "Ionization Constants of Acids and Bases, A. Laboratory Manual", 1-st Edition, Methuen & Co., Ltd., London, 1962, pp 134-143
- 103) P. G. Stecher, "The Merck Index", 8-th Edition, Merck & Co., Inc., Rahway, 1968,
- 104) J. T. Edsall and J. Wyman, "Biophysical Chemistry", Academic Press, Inc., New York 1958, vol. II, p453
- 105) B. B. Levin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 93, 50 (1961)

- 106) H. D. Rapsen and A. E. Bird, J. Pharm. Pharmacol., 15, Suppl.,
222T (1963)
- 107) W. E. Warning and C. H. Werkman, Arch. Biochim., 1, 303 (1942)
- 108) I. J. McGilberay and R. D. Strickland, J. Pharm. Sci., 56, 77
(1967)
- 109) J. H. Ford, Anal. Chem., 19, 1004 (1947)
- 110) C. S. Cummins and H. Harris, J. Gen. Microbiol., 14, 583 (1956)
- 111) S. Kotani, T. Kitaura, T. Hirano and A. Tanaka, Biken's J., 2,
129 (1959)